

Untersuchungen zur in vitro und in vivo
(experimentelle Endotoxinämie)
Wirksamkeit der synthetischen
Proteinaseinhibitoren FOY und FOY-305

Cordelia Sever

Diss
München
1985



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Aus der Abteilung für klinische Chemie
und klinische Biochemie
in der Chirurgischen Klinik Innenstadt
der Universität München
Leitung: Prof. Dr. Hans Fritz

Untersuchungen zur in vitro und in vivo
(experimentelle Endotoxinämie)
Wirksamkeit der synthetischen Proteinaseinhibitoren
FOY und FOY-305

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
an der Ludwig Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Cordelia Sever (geb. Wörle) aus Augsburg

- 1985 -

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. Fritz

Mit berichterstatter: Prof. Dr. W. Machleidt

Dekan: Prof. Dr. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 5. 12. 1985

DANKSAGUNG

Herrn Prof. Dr. H. Fritz gilt mein Dank für die Möglichkeit zur Durchführung der Versuche sowie für die Überlassung des Themas und für die hilfreiche Diskussion der Ergebnisse.

Ganz besonderen Dank aussprechen möchte ich Frau Dr. M. Jochum für ihre stete Unterstützung, ihre wertvollen Ratschläge und zuvorkommende Mitarbeit.

Für die Unterstützung bei den Tierversuchen bedanke ich mich bei Herrn Dr. H. Hamperl und den Tierpflegern, besonders Herrn M. Dechsel.

Für ihre kollegiale Zusammenarbeit und Unterstützung bei der Bestimmung der speziellen Plasmaproteine möchte ich mich bei Frau U. Hof and Frau C. Seidl bedanken.

INHALTSVERZEICHNIS

Seite

ABKÜRZUNGEN	iii
-----------------------	-----

A. EINLEITUNG	1
-------------------------	---

1. Pathobiochemische Veränderungen im septischen Schock	1
2. Chemische und pharmakologische Eigenschaften der synthetischen Proteinaseinhibitoren FOY und FOY-305 . . .	4
2.1 FOY	4
2.2 FOY-305	7

B. EXPERIMENTELLER TEIL	9
-----------------------------------	---

1. In vitro-Untersuchungen zur Stabilität von FOY und FOY-305	9
1.1 Trypsin-Test	10
1.1.1 Material und Methoden	10
1.1.2 Ergebnisse	11
1.2 Plasminogen- und Antiplasmin-Test . . .	15
1.2.1 Material und Methoden	15
1.2.2 Ergebnisse	16
1.3 Diskussion	18
2. In vivo-Wirkungen von FOY und FOY-305 auf die Endotoxinämie beim Hund	20
2.1 Material und Methoden	20
2.1.1 Endotoxin und Proteinase- hemmstoffe FOY und FOY-305 . . .	20

2.1.2	Versuchsdurchführung	20
2.1.3	Bestimmung hämatologischer Parameter	23
2.1.4	Bestimmung spezieller Plasmaproteine	23
2.1.5	Statistische Auswertung	26
2.2	Ergebnisse	27
2.2.1	Klinische und hämatologische Parameter	27
2.2.2	Spezielle Plasmaproteine	34
C.	DISKUSSION	43
D.	ZUSAMMENFASSUNG	53
E.	LITERATURVERZEICHNIS	56
	LEBENS LAUF	60

ABKÜRZUNGEN

<u>DIG (DIC)</u>	disseminierte intravaskuläre Gerinnung (Coagulation)
<u>KG</u>	Körpergewicht
<u>SEM</u>	Standardabweichung des Mittelwerts
<u>IU</u>	internationale Einheit
<u>K_i</u>	Inhibitorkonstante

<u>F XIII</u>	Faktor XIII
<u>AT III</u>	Antithrombin III
<u>α₂M</u>	α ₂ -Makroglobulin

<u>S-2222</u>	Bz-Ile-Glu-Gly-Arg-pNA
<u>S-2238</u>	H-D-Phe-Pip-Arg-pNA
<u>S-2251</u>	H-D-Val-Leu-Lys-pNA
<u>S-2266</u>	H-D-Val-Leu-Arg-pNA
<u>S-2302</u>	H-D-Pro-Phe-Arg-pNA
<u>TAME</u>	TosArgOMe
<u>Chromozym TH</u>	Tos-Gly-Pro-Arg-pNA
<u>Chromozym TRY</u>	Z-Val-Gly-Arg-pNA

<u>PT</u>	Prothrombinzeit (Quick)
<u>(A)PTT</u>	(Aktivierte) partielle Thromboplastinzeit

A. EINLEITUNG

1. Pathobiochemische Veränderungen im septischen Schock

Auf den chirurgischen Intensivstationen stellt der septische Schock, hervorgerufen durch gramnegative Keime wie E.coli, Klebsiella, Proteus und Pseudomonas aeruginosa, eines der schwersten Krankheitsbilder mit schlechter Prognose dar. Als eine frühe Phase der pathophysiologischen Prozesse wird die Schädigung von Membranen verschiedener Zelltypen durch Endotoxine betrachtet, als deren Folgeerscheinungen letztendlich die bekannten Kreislauf-, Lungen- und Nierenfunktionsstörungen auftreten. Eine erhebliche Bedeutung kommt hierbei auch dem pathologischen Verbrauch von Faktoren des Gerinnungs-, Fibrinolyse- und Komplementsystems zu, der sich häufig in einer disseminierten intravasalen Gerinnung (DIG) manifestiert (7, 16, 27, 33).

Für den Verbrauch der Plasmaproteine im septischen Schock werden verschiedene Mechanismen diskutiert. Als Folge der Membranläsionen an Leukozyten, Thrombozyten, Endothelzellen, Makrophagen und Mastzellen werden zunächst bestimmte Zellbestandteile einschließlich lysosomaler Enzyme als sogenannte Mediatoren der Entzündung freigesetzt. Ausgelöst durch Thrombokinase und Plasminogenaktivatoren kommt es dann zur klassischen Aktivierung des Gerinnungs-, Fibrinolyse- und Komplementsystems über substratspezifische Proteolyse. Zum anderen hat die Forschung der letzten Jahre gezeigt, daß auch ein Abbau der Plasmaproteine durch substratunspezifische Proteolyse erfolgen kann, wofür vor allem leukozytäre Proteinasen wie die Serinproteasen Elastase und Kathepsin G verantwortlich gemacht werden (5, 28). Diese Enzyme sind offensichtlich imstande, nahezu alle Proteine der Blutkaskadensysteme einschließlich einiger Proteinaseinhibitoren irreversibel zu inaktivieren, ehe sie durch Komplexbildung

mit α_1 -Proteinaseinhibitor (= α_1 -Antitrypsin), α_2 -Makroglobulin (α_2 M) oder α_1 -Antichymotrypsin gehemmt und über das RES eliminiert werden (22). Sowohl unspezifische Proteolyse als auch oxidative Denaturierung und Verbrauch von Inhibitoren durch Komplexierung von im Übermaß freigesetzten oder aktivierten Zielenzymen bewirken schließlich ein Ungleichgewicht zu ungunsten des protektiven endogenen Inhibitorpotentials, als dessen Folge eine deletäre Abnahme von lebenswichtigen Plasmaproteinen zu betrachten ist (10). Falls es nun gelingen würde, diesem pathologischen Verbrauch durch einen exogenen Proteinaseinhibitor mit breitem Hemmspektrum entgegenzuwirken und so das physiologische Gleichgewicht zu erhalten, wäre ein entscheidender Schritt in der Therapie des septischen Schocks getan. Unter diesem Aspekt überprüften wir die synthetischen Proteinaseinhibitoren FOY und FOY-305, die in vitro ein breites Wirkungsspektrum aufweisen, auch auf ihren therapeutischen Nutzen in vivo am experimentellen Modell der Endotoxinämie beim Hund.

Zur Beurteilung der Effekte von FOY und FOY-305 wurden Hunde während einer exogen induzierten Endotoxinämie unter kontinuierlicher Infusion der Proteinaseinhibitoren 14 Stunden lang beobachtet. Neben Blutzellen und Kreislaufparametern wurde vor allen Dingen der Konzentrationsverlauf ausgewählter Plasmaproteine verfolgt, die im Endotoxinschock exzessiv verbraucht werden. Aus der Gerinnungskaskade wurden Prothrombin und der wichtigste physiologische Inhibitor, das Antithrombin III (AT III), sowie der fibrinstabilisierende Faktor XIII (F XIII) bestimmt. Aus dem Fibrinolysesystem wurden die Faktoren Plasminogen und Antiplasmin verfolgt. Da im Endotoxinschock das Komplementsystem bevorzugt über den alternativen Weg aktiviert wird, wurde die Konzentration von Komplementfaktor C3, der am Beginn der gemeinsamen Endstrecke von alternativem und klassischem Weg steht, gemessen (11). Zusätzlich bestimmten wir die Hemmaktivität des

wichtigsten endogenen Inhibitors für nahezu alle sauren und neutralen Proteasen, $\alpha_2\text{M}$, der im septischen Schock signifikant abfällt. Diese starke Abnahme ist offensichtlich nicht nur auf eine Komplexierung von aktiven Gerinnungs- und Fibrinolyseenzymen, sondern auch auf die Inaktivierung durch extrazellulär freigesetzte lysosomale Proteinasen, wie z.B. der Elastase, zurückführen (8).

2. Chemische und pharmakologische Eigenschaften der synthetischen Proteinaseinhibitoren FOY und FOY-305

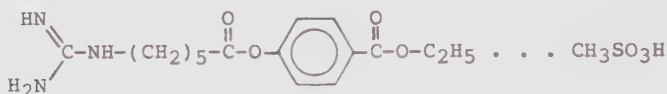
2.1 FOY

Generische Bezeichnung: Gabexatmesilat

Chemische Bezeichnung: (Ethyl 4-(6-guanidinohexanoyloxybenzoat) methansulfonat

Molekulargewicht: 417,48

Strukturformel:



Als aromatischer Ester einer ω -Guanidinosäure kann FOY einen hemmenden Einfluß auf Serinproteasen wie Trypsin, Plasma- und Pankreas-Kallikrein, Plasmin, Thrombin, Faktor Xa und C₁-Esterase ausüben (17, 23). Die Hemmwirkung kommt dadurch zustande, daß FOY primär ein Substrat für Serinproteasen darstellt und dabei sehr rasch mit den genannten Enzymen unter Bildung eines Acyl-Enzymderivates reagiert, wobei das katalytisch aktive Zentrum vorübergehend blockiert wird (18, Abb.1). Der Hemmeffekt ist unterschiedlich stark ausgeprägt, nicht nur die verschiedenen Proteasen betreffend, sondern auch bezüglich der gleichen Protease in verschiedenen Tierspezies und hängt außerdem vom verwendeten Substrat ab (22, 23, 24, 32, Tab. 1).

Durch die ubiquitär im Plasma vorhandenen Esterasen wird FOY rasch zu Ethyl-p-hydroxybenzoat und ϵ -Guanidinocapronsäure hydrolysiert (15). Diese Metaboliten sind vergleichsweise inaktiv, ϵ -Guanidinocapronsäure hat noch eine antifibrinolytische Restaktivität, die ein Hundertstel der Aktivität

von ϵ -Aminocaprinsäure aufweist (14). Die Plasmahalbwertszeit von FOY beträgt beim Menschen 70-80 sec, bei der Ratte nur 7-8 sec (24). Die Metaboliten werden hauptsächlich renal eliminiert, wobei die Halbwertszeiten bei Bolusinjektionen zwischen 6 und 12 Stunden (Ratte, Mensch) liegen (18).

Tabelle 1. Nach Ohno et al. (23).

Enzym	Herkunft	Substrat*	K_i^* mit FOY, μM
Thrombin	Mensch	S-2238	0,97
	Rind	S-2238	1,4
Faktor Xa	Mensch	S-2222	8,5
	Rind	S-2222	2,1
Plasmin	Mensch	S-2251	1,6
Plasma-Kallikrein	Schwein	S-2302	0,2
Pankreas-			
Kallikrein I	Schwein	S-2266	112
II	Schwein	S-2266	167
III	Schwein	S-2266	120

*s. Abkürzungen.

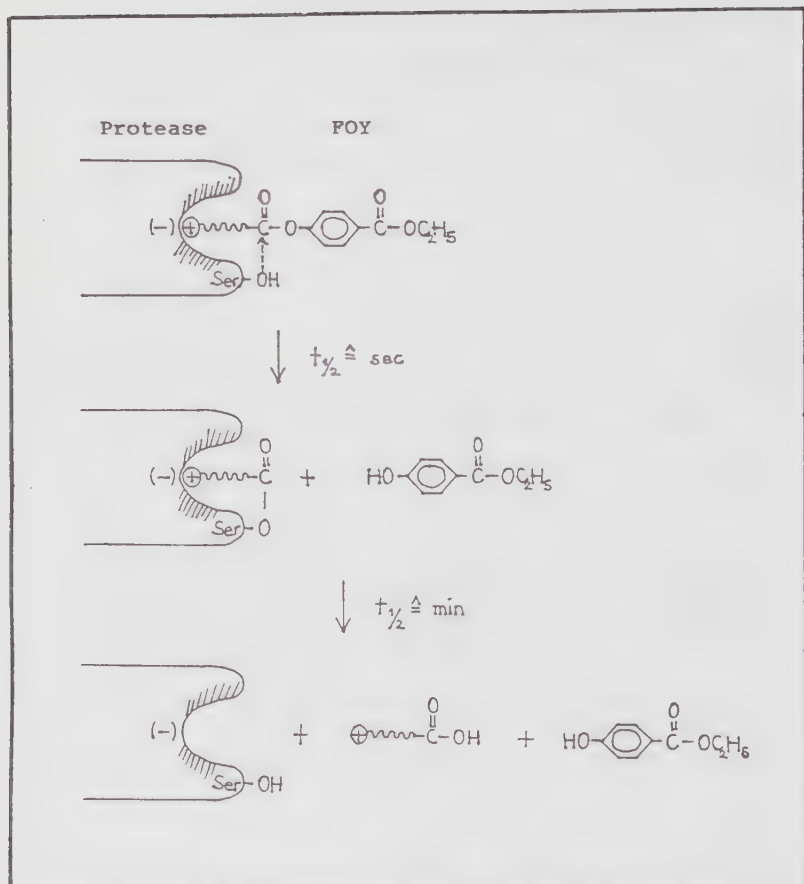


Abb. 1. Prinzip der Hemmung und Reaktivierung von Serinproteasen durch FOY (nach Chase & Shaw, 3).

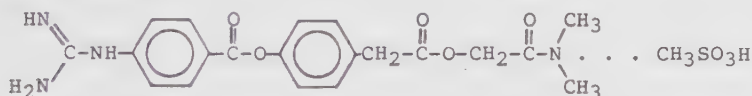
2.2 FOY-305

Generische Bezeichnung: Camostate

Chemische Bezeichnung: N,N-dimethyl-carbonylmethyl 4-(4-guanidinobenzyloxy)phenylacetat methansulfonat

Molekulargewicht: 494,52

Strukturformel:



Auch FOY-305 ist als Guanidinoester in die Gruppe der neuen Proteinaseinhibitoren mit hoher Bindungsaffinität zu Serinproteasen einzureihen. Ähnlich wie durch FOY werden durch FOY-305 die enzymatischen Aktivitäten von Trypsin, Plasmin, Plasma-Kallikrein, C₁-Esterase und Thrombin gehemmt (32). Bedingt durch erhebliche Strukturunterschiede weicht FOY-305 in einigen wichtigen Eigenschaften von FOY ab: beispielsweise sind für eine gleichstarke Hemmwirkung auf die verschiedenen Enzyme 10- bis 100-fach niedrigere Konzentrationen von FOY-305 als von FOY erforderlich (Tab. 2).

Tabelle 2. Konzentrationen zur 50%-Inhibition der Esterolyse von TAME*, 10 mM (nach Tamura et al., 32).

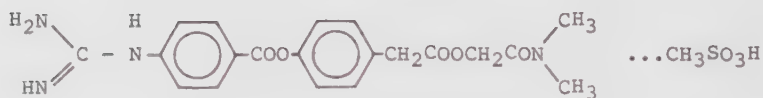
Enzym	Herkunft	Inhibitor	Inhibitor-konzentration für 50% Hemmung (M)
Trypsin	Rind	FOY	9,4 x 10 ⁻⁶
		FOY-305	3,2 x 10 ⁻⁸
Plasmin	Mensch	FOY	3,0 x 10 ⁻⁵
		FOY-305	1,9 x 10 ⁻⁷
Thrombin	Mensch	FOY	1,1 x 10 ⁻⁴
		FOY-305	5,0 x 10 ⁻⁵
Plasma-Kallikrein	Mensch	FOY	4,1 x 10 ⁻⁵
		FOY-305	3,2 x 10 ⁻⁷
C ₁ -Esterase	Mensch	FOY	5,2 x 10 ⁻⁴
		FOY-305	3,4 x 10 ⁻⁵

*s. Abkürzungen.

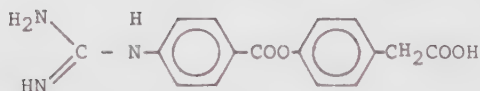
Weiterhin ist im Gegensatz zu FOY eine orale Verabreichung von FOY-305 möglich. Nach intestinaler Absorption läßt sich im Blutplasma zum größten Teil der Metabolit FOY-251 nachweisen, der noch die gleiche Bindungsspezifität zu Serinproteasen besitzt. FOY-251 wird weiter zu Guanidinobenzoessäure abgebaut, wobei die Aktivität als Proteinaseinhibitor verloren geht. Die Plasmahalbwertszeit von FOY-251 beträgt 80 min, entsprechende Daten nach i.v.-Verabreichung von FOY-305 sind noch nicht zugänglich (26).

Abb. 2. Strukturformeln der Metaboliten FOY-251 und Guanidinobenzoessäure.

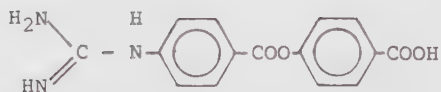
FOY-305



FOY-251



GBA



B. EXPERIMENTELLER TEIL

1. In vitro-Untersuchungen zur Stabilität von FOY und FOY-305

Aus der Literatur ist die Instabilität speziell von FOY bekannt: die Substanz wird sehr schnell von Plasmaesterasen abgebaut (15). Da im Hundeexperiment die Inhibitor-Glukoselösungen mit pH 4,3 verwendet wurden und Infusionsdauer für diese Lösungen 14 Stunden betrug, untersuchten wir mit Hilfe eines Trypsintests, ob noch weitere Effekte unabhängig von den Plasmaesterasen stabilitätsmindernd wirken. Zudem überprüften wir, inwieweit FOY-305, das durch die Umwandlung in FOY-251 auch in vivo als sehr potenter und im Vergleich zu FOY wesentlich stabilerer Plasminhemmstoff gilt, die Testsysteme beeinflusst, die zur Messung der körpereigenen Plasminogen- und Antiplasminkonzentrationen im Hundeexperiment angewandt wurden. In diesem Zusammenhang war es von besonderem Interesse, ob man zwischen der Wirkung von FOY-305 als Antiplasmin bzw. als Hemmstoff der Plasminogenaktivierung unterscheiden kann.

1.1 Trypsintest

1.1.1 Material und Methoden

Testprinzip:

1,9 - x ml Puffer	: 0,2 M TRA, 0,02 M CaCl ₂ bei pH 7,8
0,1 ml Trypsin	: Merck, Nr. 24581; Stammlsg. 10 mg/100 ml 0,0025 N HCl
x ml Inhibitor:	Ono Pharmaceutical Company, Osaka; FOY: Stammlsg. 2,5 mg/100 ml 5%-Glukoselsg. FOY-305: Stammlsg. 0,125 mg/100 ml 5%-Glukose- lsg.
1 ml Substrat	: Merck, Nr. 10754; L-BAPA*: Stammlsg. 50 mg/100 ml H ₂ O

3 ml Meßvolumen

Messung bei $\lambda = 405 \text{ nm}$, $T = 25^\circ\text{C}$

Um die Abhängigkeit der Inhibitorstabilität von der Zeit nach Auflösung der lyophilisierten Substanzen zu untersuchen, wurden die FOY- bzw. FOY-305-Stammlösungen vor Entnahme des Testvolumens jeweils 0, 20, 45 und 80 min bei 25°C vorinkubiert. Um den Einfluß des pH-Werts der Lösung auf die Stabilität zu ermitteln, wurde diese Vorinkubation bei pH 4,3 und pH 7,4 durchgeführt. Die Inhibitorlösungen wurden nun in insgesamt sechs Testserien eingesetzt (Tab. 3) und mit der Trypsin-Leerwert-Kurve (ohne Inhibitorzusatz) verglichen.

*s. Abkürzungen.

Tabelle 3. Trypsintest mit FOY (Serie 1-4) und FOY-305 (Serie 5-6).

Test- serie	Vorinkubation der Inhibitor-Lsg.		Inhibitoreinsatz im Test		
	pH	Dauer (min)	Volumen (μ l)	Menge (μ g)	Endkonzentration (M)
1	4,3	0	25	0,625	$0,5 \times 10^{-6}$
		20			
		45			
		80			
2	4,3	0	50	1,25	$1,0 \times 10^{-6}$
		20			
		45			
		80			
3	7,4	0	25	0,625	$0,5 \times 10^{-6}$
		20			
		45			
		80			
4	7,4	0	50	1,25	$1,0 \times 10^{-6}$
		20			
		45			
		80			
5	4,3	0	48	0,06	4×10^{-8}
		20			
		45			
		80			
6	7,4	0	48	0,06	4×10^{-8}
		20			
		45			
		80			

1.1.2 Ergebnisse

In Testserie 1 war die FOY-Dosierung so gewählt, daß ohne Vorinkubation eine ca. 50%-ige Inhibition der Trypsinaktivität erzielt wurde. Bereits nach 5 min Testdauer war keine Inhibition mehr nachzuweisen. Beim Einsatz der doppelten Menge FOY (nahezu 100% initiale Inhibition) war nach 8 min

Testdauer ein Verlust von 40% der Hemmaktivität zu beobachten. Nach Vorinkubation der FOY-Glukose-Lösung nahm zusätzlich die initiale Hemmaktivität ab: sie erniedrigte sich auf 35% Inhibition nach 20 min, auf 25% nach 45 min und auf 15% nach 80 min Vorinkubation bei Einsatz von 0,625 µg FOY. Weniger ausgeprägt war der Verlust an initialer Hemmaktivität bei Einsatz von 1,25 µg FOY in Serie 2, hier wurde die Trypsinaktivität auch nach 80 min Vorinkubation initial noch zu 80% gehemmt (Abb. 3, Abb. 4). Die Testserien 3 und 4 unterschieden sich von den Serien 1 und 2 nur durch den pH-Wert der FOY-Glukose-Lösung, der hier mit 7,4 dem pH-Wert von normalem Blut entsprach. Auch in diesen Serien zeigte sich mit zunehmender Vorinkubationsdauer ein Verlust an initialer Hemmaktivität. Die prozentuale Minderung an wirksamer Inhibitorkonzentration unterschied sich im einzelnen nicht wesentlich von derjenigen bei pH 4,3 (Abb. 4).

Beim Einsatz von FOY-305 in das Testsystem war ein deutlicher Unterschied zu FOY erkennbar. In allen 8 Hemmtests der Serien 5 und 6 blieb die initiale Inhibition über den Meßzeitraum hinweg konstant (keine graphische Darstellung). Die Konzentration des Inhibitors war so gewählt, daß ohne Vorinkubation bei pH 4,3 die Inhibition initial (1 min Testdauer) 50% betrug. Mit zunehmender Vorinkubationszeit war der Abfall der Hemmaktivität geringer als bei der vergleichbaren FOY-Dosierung: auch nach 80 min Vorinkubation konnten noch 35% Inhibition der Trypsinaktivität erzielt werden. Die Anhebung des pH-Werts auf 7,4 während der Vorinkubation hatte auch bei FOY-305 keinen wesentlich Einfluß auf den Testverlauf (Abb. 5).

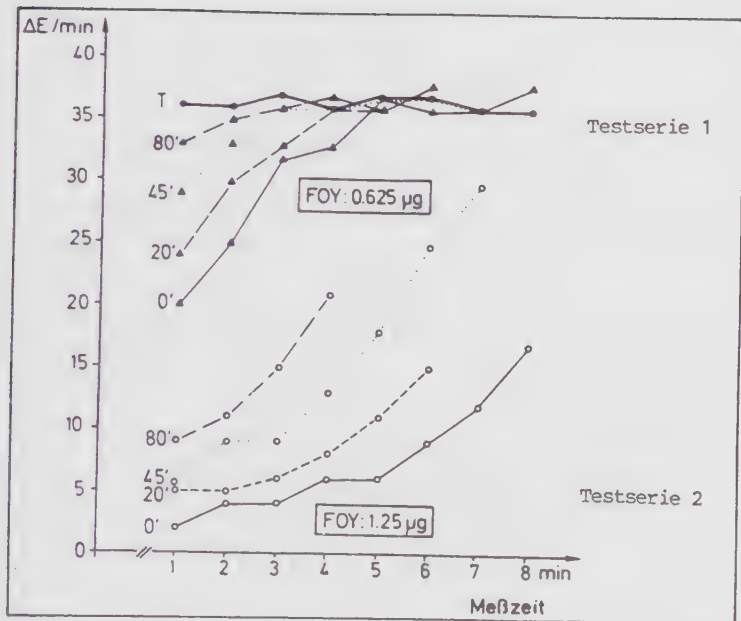


Abb. 3. Trypsinhemmung durch FOY (pH 4,3, Testserien 1 und 2).
 T = Trypsinleerwert.
 0', 20', 45', 80' = min Inkubation vor Testbeginn.

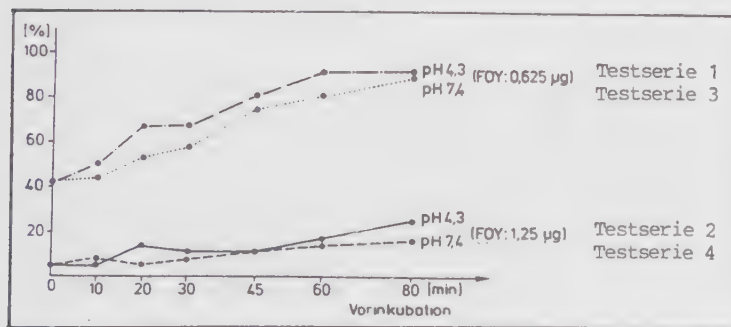


Abb. 4. Initiale Hemmwirkung von FOY in Abhängigkeit von Vorinkubation und pH-Wert der FOY-Glukoselösung in den Testserien 1 - 4. Abszisse: Extinktionsdifferenz in % des Trypsin-Leerwerts nach 1 min Reaktionsdauer.

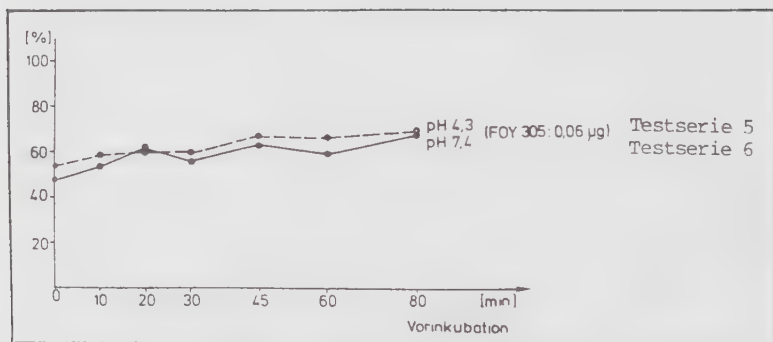


Abb. 5. Initiale Hemmwirkung von FOY-305 in Abhängigkeit von Vorinkubation und pH-Wert der FOY-305-Glukoselösung in den Testserien 5 und 6. Abszisse: wie in Abb. 4.

1.2 Plasminogen- und Antiplasmin-test

1.2.1 Material und Methoden

Genaue Angaben zu den verwendeten Testsubstanzen sind dem Abschnitt 2.1.4 "Bestimmung spezieller Plasmaproteine" des in vivo-Experiments zu entnehmen.

Plasminogen-Test:

380 µl Puffer	: 0,05 M Tris, 0,12 M NaCl pH 7,4
20 µl Plasma	: Normalplasma ± FOY-305 1:40 verdünnt mit Puffer
40 µl Aktivator:	Streptokinase 8000 IU*
20 min Inkubation bei 37°C	
840 µl Substrat	: S-2251* 3 mM
1280 µl Testvolumen	
Messung bei $\lambda = 405 \text{ nm}$, $T = 25^\circ\text{C}$	

Antiplasmin Test:

380 µl Puffer	: 0,05 M Tris, 0,12 M NaCl pH 7,4
20 µl Plasma	: Normalplasma ± FOY-305
400 µl Aktivator:	Plasmin 22 nkat/10 ml Puffer
1 min Inkubation bei 25°C	
200 µl Substrat	: S-2251* 3,5 mM
1000 µl Meßvolumen	
Messung bei $\lambda = 405 \text{ nm}$, $T = 25^\circ\text{C}$	

*s. Abkürzungen.

In beiden Testsystemen findet die Substratumsetzung durch Plasmin statt. Um Ausmaß und wirksame Konzentrationsbereiche für die Plasminhemmung durch FOY-305 zu untersuchen, wurde im Testeinsatz Normalplasma verwendet, das FOY-305 in Konzentrationen von 0,25 bis 2×10^{-4} M enthielt. Der Antiplasmin-test wurde zusätzlich mit FOY-305 ohne Plasma durchgeführt. Die eingesetzten Konzentrationen an FOY-305 entsprachen dabei den Mengen, die sich in 20 µl des Plasmas mit Inhibitorzusatz befanden (0,25 - 2,0 µg), so daß die Endkonzentrationen in beiden Testserien identisch waren. Um den Einfluß von Einfrieren und Wiederauftauen auf die Hemmaktivität der FOY-305-Lösungen festzustellen, wurden die Tests einmal mit frischen und einmal mit wieder aufgetauten FOY-305-Lösungen durchgeführt.

1.2.2 Ergebnisse

Mit steigender FOY-305-Konzentration waren ein Abfall der Plasminogen- und ein Anstieg der Antiplasminwerte zu beobachten (Tab. 4). Dabei wurden im Antiplasmin-test beim Einsatz von FOY-305 ohne Plasma wesentlich höhere Antiplasminwerte gemessen als bei gleichen FOY-305-Mengen mit Plasma (Tab. 4, Spalten 3 und 5a, b). Darüberhinaus zeigte sich, daß die Inhibitoraktivitäten in reiner Glukoselösung durch Einfrieren und Auftauen nicht beeinträchtigt wurden (Tab. 4, Spalten 3 und 4), während sie im Plasma nach dieser Behandlung erheblich abnahmen (Tab. 4, Spalten 5a und 6). Erstaunlicherweise blieb die Hemmung der Plasminogenaktivierung im Plasma jedoch vollständig erhalten (Tab. 4, Spalten 7 und 8).

Tabelle 4. Relative Plasminogen/Antiplasminwerte bei Einsatz von FOY-305 in Plasma bzw. in Glukoselösung.

1	2	Antiplasminaktivität in % Normalplasma					Plasminogenkonzentration in % von Normalplasma	
		3	4	5a	5b	6	7	8
		FOY-305 in Glukoselösung					FOY-305 in Plasma	
		frisch		eingefroren		eingefroren	frisch	eingefroren
FOY-305 Konz. in Plasma bzw. Glukoselösung (mol/l)	FOY-305 im Testvolumen (µg)	frisch	eingefroren	experim.	theoretisch			
0	0	0	0	100	100		100	100
0.25 x 10 ⁻⁴	0.25	63	63	101	163		37,8	40,0
0.50 x 10 ⁻⁴	0.5	124	125	124	224		21,8	22,9
1.00 x 10 ⁻⁴	1.0	248	246	175	348		9,6	9,7
2.00 x 10 ⁻⁴	2.0	496	500	230	596		1,2	2,6

Erklärung zu den Spalten:

1. Konzentration von FOY-305 in Plasma bzw. Glukoselösung vor Einsatz ins Testsystem.
2. Im Test eingesetzte Menge von FOY-305.
3. Antiplasminaktivität von FOY-305 in Glukoselösung in % von Normalplasma (= 100%).
4. Wie 3, nach Einfrieren und Wiederauftauen.
5. Antiplasminaktivität von FOY-305 gelöst in Plasma in % von Normalplasma (= 100%).
 - a) experimentell gemessene Werte;
 - b) theoretisch errechnete Werte durch Addition von 100% (Antiplasminaktivität von Normalplasma) + Werte der Spalte 3 (Antiplasminaktivität FOY-305).
6. Wie 5(a), nach Einfrieren und Wiederauftauen.
7. Relative Plasminogenkonzentration in % von Normalplasma bei Einsatz von FOY-305 in Plasma.
8. Wie 7, nach Einfrieren und Wiederauftauen.

1.3 Diskussion

Wie schon mehrfach in der Literatur beschrieben ist eine Anwendung von FOY als Proteinaseinhibitor nur unter kontinuierlicher Infusion sinnvoll, da die Substanz nicht nur von den Plasmaestern, sondern auch von den zu hemmenden Proteinasen rasch gespalten wird (vgl. auch Abb. 1). Da FOY darüberhinaus bereits nach Auflösen in Glukoselösung einen kontinuierlichen Aktivitätsverlust erleidet, muß besonders bei Verabreichung über einen Zeitraum von mehreren Stunden eine entsprechend hohe InhibitorKonzentration in der Infusionslösung gewählt werden. Die erhoffte Stabilisierung des Inhibitors in Lösung durch den niedrigen pH-Wert von 4,3 bestätigte sich in unserem Testmodell nicht.

FOY-305 hingegen erwies sich im Trypsintest stabiler. Nach Auflösen nahm die Hemmaktivität weniger rasch und stark ab als bei FOY. Außerdem blieb die Hemmwirkung auf Trypsin im Test konstant (selbst bei Anwendung wesentlich geringerer Konzentrationen!), was darauf hinweist, daß das katalytisch aktive Zentrum des Enzyms durch FOY-305 viel länger als durch FOY blockiert wird.

Im Plasminogen und Antiplasmin-test zeigte sich, daß bei Plasmakonzentrationen von FOY-305 im 10^{-4} M-Bereich die Werte durch die Anwesenheit des Inhibitors beeinflußt und somit nicht mehr die Plasma-eigenen Plasminogen/Antiplasmin-Konzentrationen wiedergegeben werden. Da beide Testsysteme betroffen waren, dürfte dies vor allem auf eine Plasminhemmung zurückzuführen sein. Durch Einfrieren und Auftauen des Plasmas konnte jedoch die Antiplasminwirkung bei gleichbleibender Hemmung der Plasminogenaktivierung praktisch aufgehoben werden.

Für in vivo-Versuche muß daher die Entstehung des Abbauprodukts Guanidinobenzoessäure in Betracht gezogen werden, welches auf Grund seiner Strukturähnlichkeit mit PAMBA möglicherweise als reiner Aktivierungshemmstoff wirkt. In diesem Fall ist nur eine Beeinflussung des Plasminogentests zu erwarten, vorausgesetzt, daß keine Plasmin-hemmenden Konzentrationen an FOY-305 mehr im Plasma vorhanden sind.

Im Antiplasmin-test konnte außerdem eine wesentlich stärkere Beeinflussung bei Einsatz von FOY-305 ohne Plasma beobachtet werden. Die Minderung der Wirksamkeit des Inhibitors durch Plasma ist entweder auf eine Inaktivierung durch Abbau (bei einer Halbwertszeit von 80 min des aktiven Metaboliten eher unwahrscheinlich) oder aber auf eine Bindung des Inhibitors an Plasmaeiproteine (z.B. Albumin) zurückzuführen.

2. In vivo-Wirkungen von FOY und FOY-305 auf die Endotoxinämie beim Hund

2.1 Material und Methoden

2.1.1 Endotoxin und Proteinasehemmstoffe FOY und FOY-305

Endotoxin von E.coli, 026:K 60 (B) H11 k(H 311b), wurde nach der Methode von O'Neill und Todd (25) durch Extraktion mit Trichloressigsäure und erhitztem Phenol gewonnen. Zur Verabreichung wurde das Lyophilisat in physiologischer Kochsalzlösung gelöst.

FOY und FOY-305 wurden von Ono Pharmaceutical Company, Osaka, Japan, bezogen. Die lyophilisierten Substanzen wurden in 5%-iger Glukoselösung bei einem pH-Wert von 4,3 gelöst.

2.1.2 Versuchsdurchführung

Als Versuchstiere dienten Bastardhunde beiderlei Geschlechts von 9 bis 12 kg Gewicht. Jeweils 6 Hunde wurden zufällig einer der acht Gruppen zugeteilt (Tab. 5). Vor Infusionsstart wurden alle Hunde durch intravenöse Verabreichung von Pentobarbital (Nembutal®) in einer Dosierung von 30 mg/kg KG (= Körpergewicht) anästhesiert. Falls Hunde unruhig wurden, bekamen sie im Laufe des Versuchs geringe Mengen Nembutal® nachgespritzt. Die Hunde wurden endotracheal intubiert. Als venöse Zugänge dienten zwei PVC-Katheter in den beiden Venae femorales, als arterieller Zugang wurde von der Leiste aus über die Arteria femoralis ein Katheter in die Aorta descendens geschoben. Über ein Statham-Element und einen Siemens-Oszillographen wurden kontinuierlich der mittlere arterielle Druck und die Pulsfrequenz gemessen.

Tabelle 5. Einteilung der 48 Hunde in 8 verschiedene Behandlungsgruppen (KG = Körpergewicht).

GRUPPE (n=6)	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII
Endotoxin (0,5mg/kg KG/h)	0	+	0	+	0	+	0	+
FOY (25mg/kg KG/h)	0	0	+	+	0	0	0	0
FOY (5mg/kg KG/h)	0	0	0	0	+	+	0	0
FOY-305 (5mg/kg KG/h)	0	0	0	0	0	0	+	+

Alle Tiere erhielten über den gesamten Versuchszeitraum isotone Kochsalzlösung i.v. (40 ml/h). Die Endotoxinämie wurde durch 2-stündige Infusion von E.coli-Endotoxin induziert, in Gruppen mit Inhibitormedikation wurde der Hemmstoff in Glukoselösung mittels i.v.-Dauerinfusion über 14 Stunden verabreicht (genaue Dosierungen sind dem Infusionschema in Abb. 6 zu entnehmen). Die Hunde in der Kontrollgruppe erhielten weder Endotoxin noch Inhibitor. In den einzelnen Gruppen wurden mit physiologischer Kochsalzlösung anstelle von Endotoxin- und Inhibitorinfusionen die Flüssigkeitsmengen so angeglichen, daß alle Hunde gleiche Volumina zu gleichen Zeitpunkten infundiert bekamen.

Die erste Blutabnahme und Messung des mittleren arteriellen Blutdrucks wurden unmittelbar vor Start der Infusionen vorgenommen, weitere Messungen und Blutentnahmen erfolgten nach 2, 6, 10 und 14 Stunden (Abb. 6). Das insgesamt je Hund entnommene Blutvolumen überstieg nicht die Menge von 40 ml.

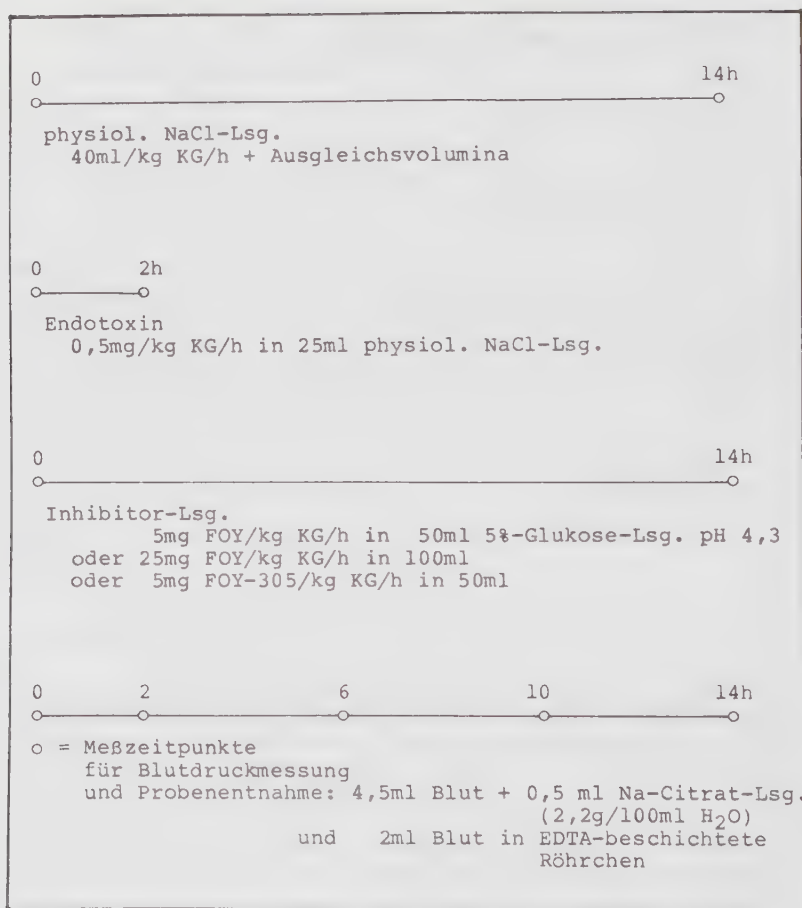


Abbildung 6. Infusionsschema und Meßzeitpunkte.

2.1.3 Bestimmung hämatologischer Parameter

Blutzellen und Hämatokrit wurden sofort nach Probenentnahme im EDTA-Blut bestimmt:

Leukozyten: Zählung im Coulter Counter, Mod.B
Thrombozyten: Auszählung mikroskopisch in der Neubauer Zählkammer
Hämatokrit: Bestimmung in Mikrohämatokritkapillaren

2.1.4 Bestimmung spezieller Plasmaproteine

Das Blut zum Nachweis der Plasmaproteine wurde durch Natriumcitrat ungerinnbar gemacht (Abb. 6), sofort zentrifugiert und das Plasma bis zur endgültigen Durchführung der Tests bei -70°C aufbewahrt.

Zur quantitativen Bestimmung von Prothrombin, AT III, Plasminogen und Antiplasmin wurden folgende Substrate verwendet:

Prothrombin: Chromozym TH* von Boehringer, Mannheim
AT III: S-2238* von Deutsche Kabi, München
Antiplasmin
und Plasminogen: S-2251* von Deutsche Kabi, München

Die Anleitungen der Firmen wurden gemäß Tabelle 6 modifiziert.

α_2 M wurde über die amidolytische Aktivität von Trypsin im Komplex mit α_2 M gemessen, nachdem das nicht im Komplex gebundene Trypsin durch Aprotinin gehemmt wurde. Als chromogenes Substrat diente Chromozym TRY*, die Bestimmung wurde gemäß den Anleitungen zum Test-Kit der Firma Boehringer, Mannheim, durchgeführt.

*s. Abkürzungen.

Tabelle 6. Versuchsbedingungen zur photometrischen Messung verschiedener Gerinnungs- und Fibrinolysefaktoren mit chromogenen Substraten.

	PUFFER μl	pH	HUNDEFASINA μl	AKTIVIERUNG durch	μl	INKUBATION min °C	CHROMOGENES SUBSTRAT μl
Prothrombin	1,025 0,05 M Tris, 0,1 M NaCl, 0,01 M CaCl ₂ , 10 g Trasylol/ml	8,6	30 1:20 verdünnt mit 0,9% NaCl	Cephalin RVV ²	100 50 = 6 μg	5 25	125 Chromozym TH, 1,5 M
Antithrombin III	370 0,05 Tris, 7,5 mM EDTA, 3 IU Heparin/ml	8,4	30 1:100 verdünnt mit Puffer	Thrombin 45 nkat/25 ml	100	5 25	300 S-2238, 0,75 M; 1 mg Polybrenze ₃ /ml
Plasminogen	380 0,05 M Tris, 0,12 M NaCl	7,4	20 1:5 verdünnt mit Puffer	Kabikinas = Streptokinase, 8.000 IU	40	20 37	840 S-2251, 3 mM
Antiplasmin	380 0,05 M Tris, 0,12 M NaCl	7,4	20 unverdünnt	Plasmin 22 nkat/10 ml Puffer	400	1 25	200 S-2251, 3,5 mM

IU = Internationale Einheit

- 1)PTT-Reagenz von Boehringer, Mannheim
2)Russel's Viper Venom von Sigma, München
3)von EGA-Chemie, Steinheim

Die biologische Aktivität von F XIII wurde mit dem Faktor-XIII-Schnelltest der Behringwerke, Marburg (Nr. OTXS 10) nach der Modifikation von Bohn und Haupt (2) bestimmt. Durch Anwendung von sehr kleinen Verdünnungsschritten wurde dieser semiquantitative Test zu einer nahezu quantitativen Methode verfeinert.

Die Bestimmung des Komplement-Faktors C3 erfolgte mittels radialer Immundiffusion nach Mancini et al. (13):

3 ml einer 1%-Agarose wurden mit 150 µl Ziegenantiserum gegen Hundekomplement C3 vermischt (Nordic, Tilburg, The Netherlands) und in transparente Schalen (Desaga, Heidelberg) eingefüllt. Zur Immunpräzipitation wurden 10 µl des 1:8 verdünnten Hundeplasmas in ausgestanzte Vertiefungen des verfestigten Agarosegels pipettiert. Referenzkurven wurden durch eine Verdünnungsreihe (1:8, 1:16, 1:32) des 0-Wert-Plasmas jedes einzelnen Hundes erstellt. Das Quadrat des Durchmessers der Präzipitationsringe wurde gegen die Konzentration in Prozent (100%, 50%, 25%) aufgetragen und aus dieser Kurve die Konzentration der restlichen Plasmaproben in % des Ausgangswertes eines jeden Hundes bestimmt.

Wegen der Variabilität der Ausgangswerte bei den verschiedenen Hunden wurden alle Plasmaproteinkonzentrationen in % des Ausgangswertes zum Zeitpunkt 0 ausgedrückt. Da in den Endotoxin-behandelten Gruppen II, IV, VI und VIII große Hämatokritschwankungen auftraten, wurden die im Plasma bestimmten relativen Konzentrationen korrigiert auf den jeweiligen Hämatokrit zum Zeitpunkt 0.

2.1.5 Statistische Auswertung

Zur statistischen Auswertung wurde der Student-t-Test für unverbundene Stichproben angewendet. Es wurden ausgetestet:

- o Kontrollgruppe (I) gegen Endotoxin-(II) bzw. FOY (III, V, VII) Gruppen
- o Endotoxingruppe (II) gegen FOY + Endotoxin-Gruppen (IV, VI, VIII)

In den Gruppen, in denen Hunde verstarben, wurden nur Werte der Überlebenden Hunde zur Ermittlung der Mittelwerte und statistischen Signifikanzen herangezogen. Ein Ergebnis wurde für $p \leq 0,05$ als signifikant erachtet.

2.2 Ergebnisse

2.2.1 Klinische und hämatologische Parameter

Klinische Beobachtungen. Hunde der Kontrollgruppe (I) verhielten sich während des ganzen Beobachtungszeitraums vollkommen unauffällig, wohingegen Tiere der Endotoxin-behandelten Gruppen (II, IV, VI, VIII) in unterschiedlichem Ausmaß die bekannten Symptome einer Endotoxinämie aufwiesen: Fieber, Diarrhoe (teilweise blutig) und Erbrechen.

Die Todesursache bei den verstorbenen Hunden der Endotoxin + Inhibitor-behandelten Gruppen (s.u.) war massives Kreislaufversagen verbunden mit respiratorischer Insuffizienz.

Mortalität. Sämtliche Hunde überlebten in den Gruppen I (Kontrolle), II (nur Endotoxin), V und VII (nur niedrige FOY-Dosierung bzw. FOY-305). In Gruppe III (nur hohe FOY-Dosierung) starb ein Hund nach 4 Stunden.

In keiner der Endotoxin + Inhibitor-behandelten Gruppen überlebten alle Hunde den Beobachtungszeitraum von 14 Stunden: bei hoher FOY-Dosierung (Gruppe IV) verstarb ein Hund bereits nach 1 Stunde, ein weiterer nach 4,5 Stunden, alle übrigen nach 8,5 (n=2) und 10,5 (n=2) Stunden; bei niedriger FOY-Dosierung (Gruppe VI) starb ein Hund nach 9 Stunden, bei FOY-305-Medikation (VIII) starben zwei Hunde nach 7 bzw. 7,5 Stunden.

Leukozyten. In der Kontrollgruppe I zeigten die Leukozytenzahlen nur geringfügige Schwankungen; dies änderte sich auch nicht bei alleiniger Inhibitorinfusion in den Gruppen III, V und VII (Tab. 7).

Das Verhalten der Leukozyten bei Endotoxin-behandelten Hunden (Gruppen II, IV, VI und VIII) entsprach in typischer Weise dem Verlauf einer sich entwickelnden Sepsis: es trat ein hochsignifikanter Leukozytensturz nach 2 Stunden ($p < 0,005$) auf, gefolgt von einem exzessiven Anstieg bis zum 14 h-Wert (Tab. 8, Abb. 7). Infusionen von Inhibitoren während der Endotoxinämie hatten keinen Einfluß auf diesen Verlauf.

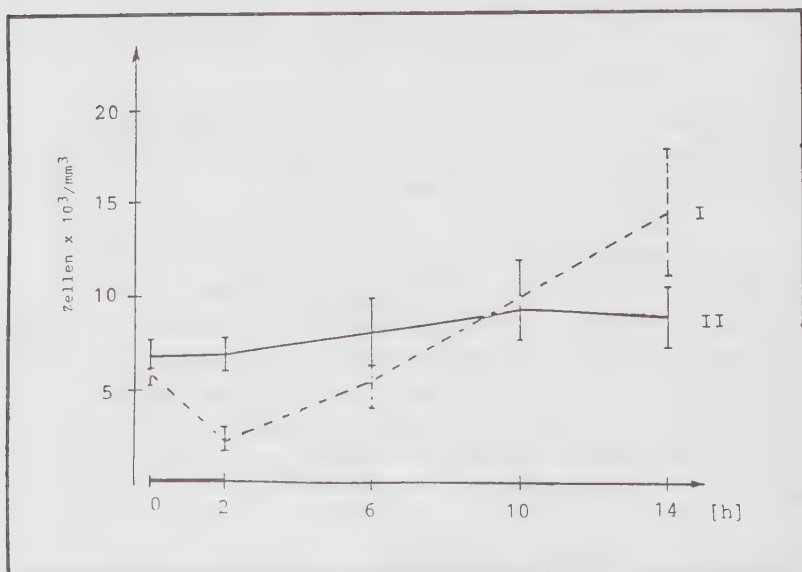


Abbildung 7. Verhalten der Leukozytenwerte ($\bar{x} \pm \text{SEM}$) bei der Kontrollgruppe I und Endotoxingruppe II.

Thrombozyten. Da die Auszählung aus logistischen Gründen durch verschiedene Personen erfolgte (was seinen Niederschlag in den hohen Standardabweichungen fand), müssen die gemessenen Werte (Tab. 7 und 8) mit Vorbehalt beurteilt werden. Ein signifikanter Abfall nach 2 h ließ sich jedoch bei allen Endotoxin-behandelten Gruppen (II, IV, VI, VIII) nachweisen (Tab. 8).

Hämatokrit. In Kontrollgruppe I und den Inhibitor-behandelten Gruppen III, V und VII waren insgesamt nur geringe Schwankungen zu beobachten. In den Gruppen V (FOY 5mg) und VII (FOY-305) trat initial ein leichter Anstieg des Hämatokrits auf mit signifikanten Unterschieden zur Kontrollgruppe I bei den 2h-, 6h- und 10h-Werten ($p < 0,05$). Gruppe III (FOY 25mg) und I zeigten parallele Verläufe (Abb. 8, Tab. 7).

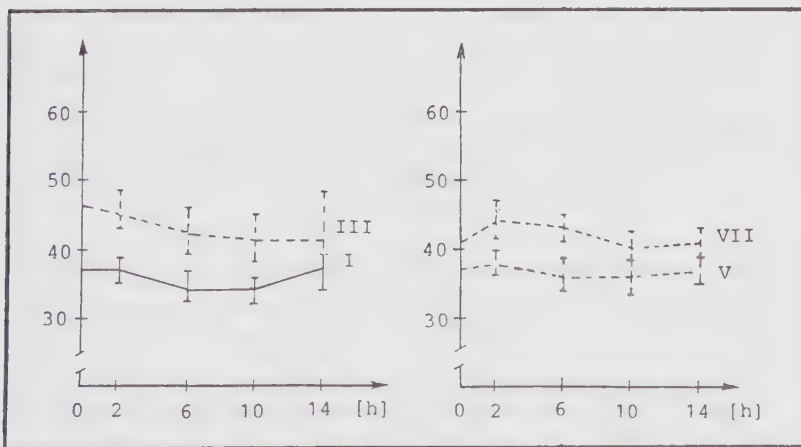


Abbildung 8. Hämatokritverlauf in den Gruppen I (Kontrolle), III (FOY 25mg), V (FOY 5mg) und VII (FOY-305).

Alle Hunde der Gruppen II, IV, VI und VIII zeigten nach Endotoxininfusion die zu erwartende Hämokonzentration während des gesamten Beobachtungszeitraums (gegenüber Kontrollgruppe mit $p < 0,01$ signifikant). Am höchsten stieg der Hämatokrit unter Infusion von Endotoxin+FOY in der hohen Dosierung bei Gruppe IV (Abb. 9, Tab. 8).

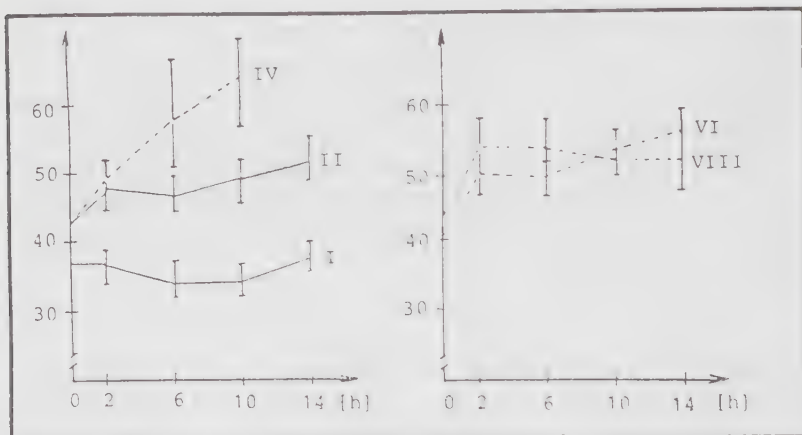


Abbildung 9. Hämatokritverlauf in den Gruppen I (Kontrolle), II (Endotoxin), IV (Endotoxin + FOY 25 mg), VI (Endotoxin + FOY 5 mg) und VIII (Endotoxin + FOY-305).

Blutdruck. Der mittlere arterielle Blutdruck fiel bei den Gruppen I, III, V und VII (ohne Endotoxin-Behandlung) kontinuierlich ab im Verlauf des Experiments.

Bei den Endotoxin-behandelten Gruppen II, IV und VIII erfolgte der Abfall abrupt innerhalb der ersten zwei Stunden, etwas weniger deutlich in Gruppe VI (Endotoxin + FOY in niedriger Dosierung). Kontroll- und Endotoxingruppe (I und II) unterschieden sich signifikant beim 2h-Wert; bei

den 6h-, 10h- und 14h-Werten waren Gruppenunterschiede statistisch nicht mehr zu belegen (Tab. 7, 8; Abb. 10).

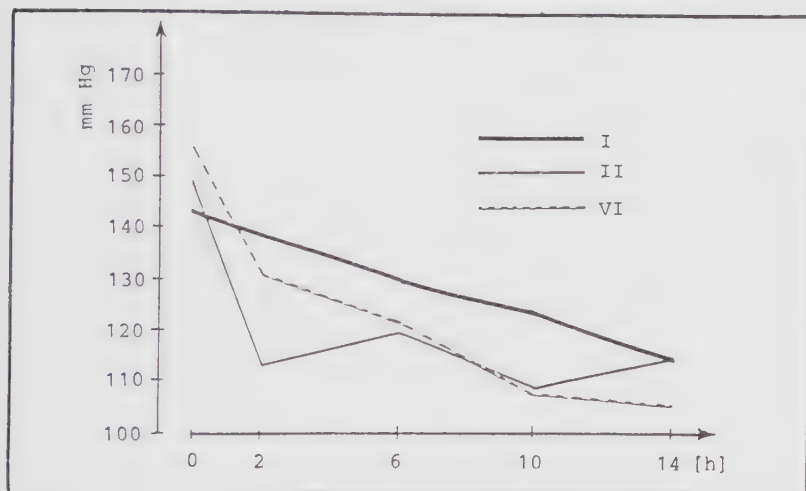


Abbildung 10. Blutdruckkurve der Gruppen I (Kontrolle), II (Endotoxin) und VI (Endotoxin + FOY 5 mg).

Tabelle 7. Mittelwerte $\pm$ SEM der hämatologischen Parameter in den Gruppen I, III, V, VII.
n.b. = nicht bestimmt

PARAMETER	TESTZEIT	I (Kontrolle)	III (FOY 25 mg)	V (FOY 5 mg)	VII (FOY-305)
Leukozyten (Zellen $\times 10^3/\text{mm}^3$)	0	6.8 $\pm$ 0.9	6.5 $\pm$ 1.4	10.1 $\pm$ 2.2	6.0 $\pm$ 1.0
	2	6.9 $\pm$ 0.9	8.6 $\pm$ 1.9	9.8 $\pm$ 2.3	6.9 $\pm$ 1.4
	6	8.0 $\pm$ 1.8	6.8 $\pm$ 1.7	9.9 $\pm$ 1.9	8.6 $\pm$ 0.9
	10	9.4 $\pm$ 1.6	9.6 $\pm$ 2.5	10.6 $\pm$ 1.8	8.8 $\pm$ 1.5
	14	8.9 $\pm$ 1.6	9.3 $\pm$ 1.9	9.1 $\pm$ 1.8	9.9 $\pm$ 0.8
Thrombozyten (Zellen $\times 10^3/\text{mm}^3$)	0	159.5 $\pm$ 13.0	178.0 $\pm$ 30.5	345.3 $\pm$ 36.8	199.0 $\pm$ 32.0
	2	166.0 $\pm$ 9.0	178.7 $\pm$ 26.9	263.9 $\pm$ 31.3	169.0 $\pm$ 41.0
	6	165.0 $\pm$ 14.0	116.7 $\pm$ 22.9	222.3 $\pm$ 25.7	149.0 $\pm$ 34.0
	10	147.0 $\pm$ 14.0	118.3 $\pm$ 30.0	189.9 $\pm$ 42.9	159.0 $\pm$ 34.0
		n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
Hämatokrit (%)	0	37 $\pm$ 1.6	46 $\pm$ 1.8	37 $\pm$ 2.0	41 $\pm$ 1.5
	2	37 $\pm$ 1.9	45 $\pm$ 1.7	38 $\pm$ 1.5	44 $\pm$ 2.7
	6	34 $\pm$ 1.9	42 $\pm$ 2.4	36 $\pm$ 2.2	43 $\pm$ 2.1
	10	34 $\pm$ 1.7	41 $\pm$ 3.1	36 $\pm$ 2.0	40 $\pm$ 2.6
	14	37 $\pm$ 1.8	41 $\pm$ 6.8	37 $\pm$ 2.2	41 $\pm$ 2.2
Blutdruck (mm Hg)	0	143 $\pm$ 4.6	146 $\pm$ 9.9	143 $\pm$ 7.8	163 $\pm$ 10.1
	2	139 $\pm$ 4.4	140 $\pm$ 10.8	144 $\pm$ 9.4	162 $\pm$ 8.0
	6	130 $\pm$ 7.2	108 $\pm$ 20.8	134 $\pm$ 3.2	150 $\pm$ 7.2
	10	123 $\pm$ 5.3	125 $\pm$ 13.2	130 $\pm$ 3.7	142 $\pm$ 11.3
	14	114 $\pm$ 5.1	123 $\pm$ 13.0	121 $\pm$ 10.4	144 $\pm$ 10.3

Tabelle 8. Mittelwerte $\pm$ SEM der hämatologischen Parameter in den Gruppen I, II, IV, VI, VIII.
n.b. = nicht bestimmt.

PARAMETER	TESTZEIT	I (Kontrolle)	II (Endotoxin)	IV (Endotoxin + EGY 25 mg)	VI (Endotoxin + EGY 5 mg)	VIII (Endotoxin + EGY-305)
Leukozyten (Zellen $\times 10^3/\text{mm}^3$)	0 2 6 10 14	6.8 $\pm$ 0.9 6.9 $\pm$ 0.9 8.0 $\pm$ 1.8 9.4 $\pm$ 1.6 8.9 $\pm$ 1.6	5.4 $\pm$ 0.4 2.3 $\pm$ 0.5 5.3 $\pm$ 1.4 9.0 $\pm$ 2.0 14.5 $\pm$ 3.4	6.5 2.3 $\pm$ 1.2 3.7 $\pm$ 1.3 10.3 $\pm$ 2.2 10.3 $\uparrow$	7.5 $\pm$ 1.0 1.4 $\pm$ 0.2 4.9 $\pm$ 1.4 9.2 $\pm$ 3.0 13.3 $\pm$ 3.6	5.2 $\pm$ 0.5 2.4 $\pm$ 1.0 5.8 $\pm$ 1.8 13.9 $\pm$ 2.0 22.4 $\pm$ 2.5
Thrombozyten (Zellen $\times 10^3/\text{mm}^3$)	0 2 6 10	169.5 $\pm$ 13.0 166.0 $\pm$ 9.0 165.0 $\pm$ 14.0 147.0 $\pm$ 14.0 n.b.	173.0 $\pm$ 22.0 95.0 $\pm$ 21.0 122.0 $\pm$ 21.0 129.0 $\pm$ 27.0 n.b.	136.0 $\pm$ 21.0 88.0 $\pm$ 19.0 153.0 $\pm$ 60.0 83.0 $\pm$ 31.0 83.0 $\uparrow$	286.0 $\pm$ 41.0 122.3 $\pm$ 25.4 170.2 $\pm$ 30.5 192.0 $\pm$ 40.8 n.b.	196.0 $\pm$ 49.0 145.0 $\pm$ 27.0 209.0 $\pm$ 41.0 137.0 $\pm$ 33.0 n.b.
Hämatokrit (%)	0 2 6 10 14	37 $\pm$ 1.6 37 $\pm$ 1.9 34 $\pm$ 1.9 34 $\pm$ 1.7 37 $\pm$ 1.8	43 $\pm$ 3.1 48 $\pm$ 2.1 47 $\pm$ 2.1 50 $\pm$ 3.2 52 $\pm$ 2.6	43 $\pm$ 3.0 49 $\pm$ 3.5 58 $\pm$ 7.5 64 $\pm$ 7.2 64 $\uparrow$	39 $\pm$ 1.7 49 $\pm$ 2.7 48 $\pm$ 2.1 52 $\pm$ 2.7 55 $\pm$ 3.9	44 $\pm$ 1.7 53 $\pm$ 3.3 53 $\pm$ 3.5 51 $\pm$ 1.8 51 $\pm$ 2.7
Blutdruck (mm Hg)	0 2 6 10 14	143 $\pm$ 4.6 139 $\pm$ 4.4 130 $\pm$ 7.2 123 $\pm$ 5.3 114 $\pm$ 5.1	148 $\pm$ 5.1 113 $\pm$ 8.0 120 $\pm$ 6.3 109 $\pm$ 8.3 114 $\pm$ 2.2	167 $\pm$ 5.0 119 $\pm$ 4.3 113 $\pm$ 18.1 0 0 $\uparrow$	156 $\pm$ 8.1 131 $\pm$ 6.8 122 $\pm$ 7.5 108 $\pm$ 13.0 106 $\pm$ 27.8	161 $\pm$ 6.2 110 $\pm$ 10.1 111 $\pm$ 15.1 123 $\pm$ 11.3 118 $\pm$ 8.1

2.2.2 Spezielle Plasmaproteine

Kontroll- und Endotoxingruppe. Die Wirksamkeit des verwendeten Endotoxins zeigte sich besonders deutlich bei Analyse der gemessenen Konzentrationen einzelner Plasmaproteine. In der Kontrollgruppe blieben die Konzentrationen sämtlicher Proteine annähernd konstant bzw. waren nach 14h um höchstens 15% vermindert. In der Endotoxin-behandelten Gruppe fielen alle Proteinkonzentrationen bis 6h nach Experimentbeginn ab. Bis zum 14h-Wert zeigte sich eine weitere Abnahme von Komplement C3, F XIII, Prothrombin und Plasminogen, während sich die Konzentrationen von Antiplasmin schon nach 6h und die von α_2 M nach 10h stabilisierten. Am stärksten ausgeprägt war der Abfall bei Plasminogen (14h: $46,6 \pm 6,7\%$ des Ausgangswerts), gefolgt von Prothrombin (14h: $47,0 \pm 8,7\%$), F XIII (14h: $48,5 \pm 5,4\%$) und Komplement C3 (14h: $51,9 \pm 8,7\%$). Die Inhibitorproteine nahmen hingegen bis zum 14h-Wert weniger stark ab: AT III auf $63,3 \pm 8,4\%$, Antiplasmin auf $73,0 \pm 10,0\%$, α_2 M auf $78,7 \pm 6,6\%$. Mit Ausnahme des 6h-Wertes von F XIII lagen zu entsprechenden Zeitpunkten alle gemessenen Proteinkonzentrationen der Endotoxingruppe II signifikant unter denjenigen der Kontrollgruppe I (Abb. 11; Tab. 10, 11).

Inhibitor-behandelte Gruppen. Beim Vergleich von Gruppe I (Kontrollgruppe) mit Gruppe III (FOY in der hohen Dosierung) zeigten sich vereinzelt signifikant niedrigere Werte: bei 2h für AT III, bei 10h für α_2 M und bei 14h für F XIII. In Gruppe V (FOY in niedriger Dosierung) ließen sich gegenüber der Kontrollgruppe keine signifikanten Unterschiede feststellen. Hochsignifikant unterschieden sich die Plasminogenkonzentrationen der Gruppe VII (FOY-305) von denjenigen der Kontrollgruppe ($p < 0,005$): mit Ausnahme des ersten Meßpunkts fielen die gemessenen Konzentrationen nahezu bis zur Nachweisgrenze ab. Ebenfalls zu vermerken in dieser

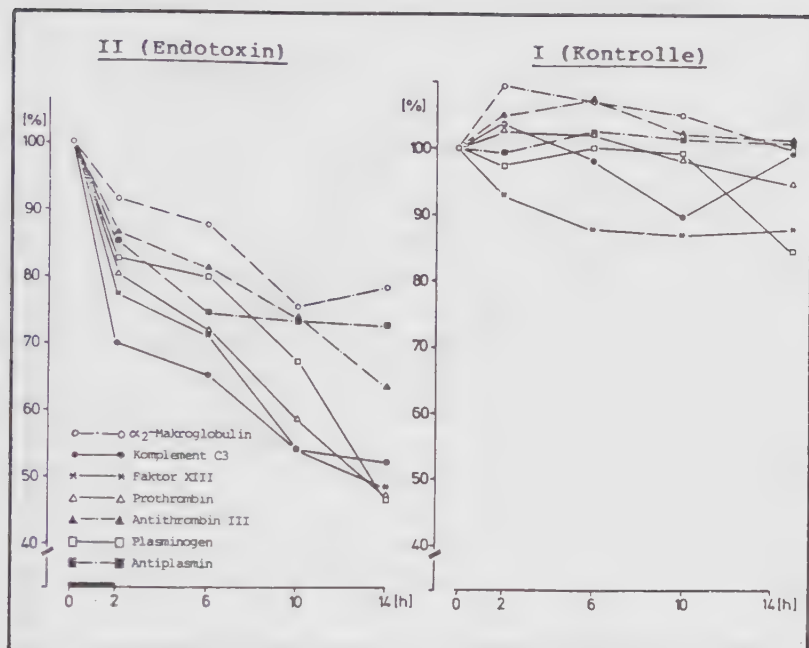


Abbildung 11. Verlauf der Proteinkonzentrationen (Mittelwerte) in den Gruppen I und II.

Gruppe sind die signifikant niedrigeren α_2^M -Konzentrationen bei 2h und 6h (Tab. 9, 10).

Endotoxin + Inhibitor-Gruppen. Im Vergleich mit der Endotoxingruppe ließ sich in Gruppe VI eine Beeinflussung der Plasmaproteinkonzentrationen durch FOY-Infusionen in niedriger Dosierung während Endotoxinämie nicht nachweisen (Abb. 11; Tab. 11, 12). In Gruppe IV (Abb. 12) wiesen die Ergebnisse auf eine Verstärkung der Verbrauchskoagulopathie durch hochdosierte FOY-Infusion hin, da die Mittelwerte

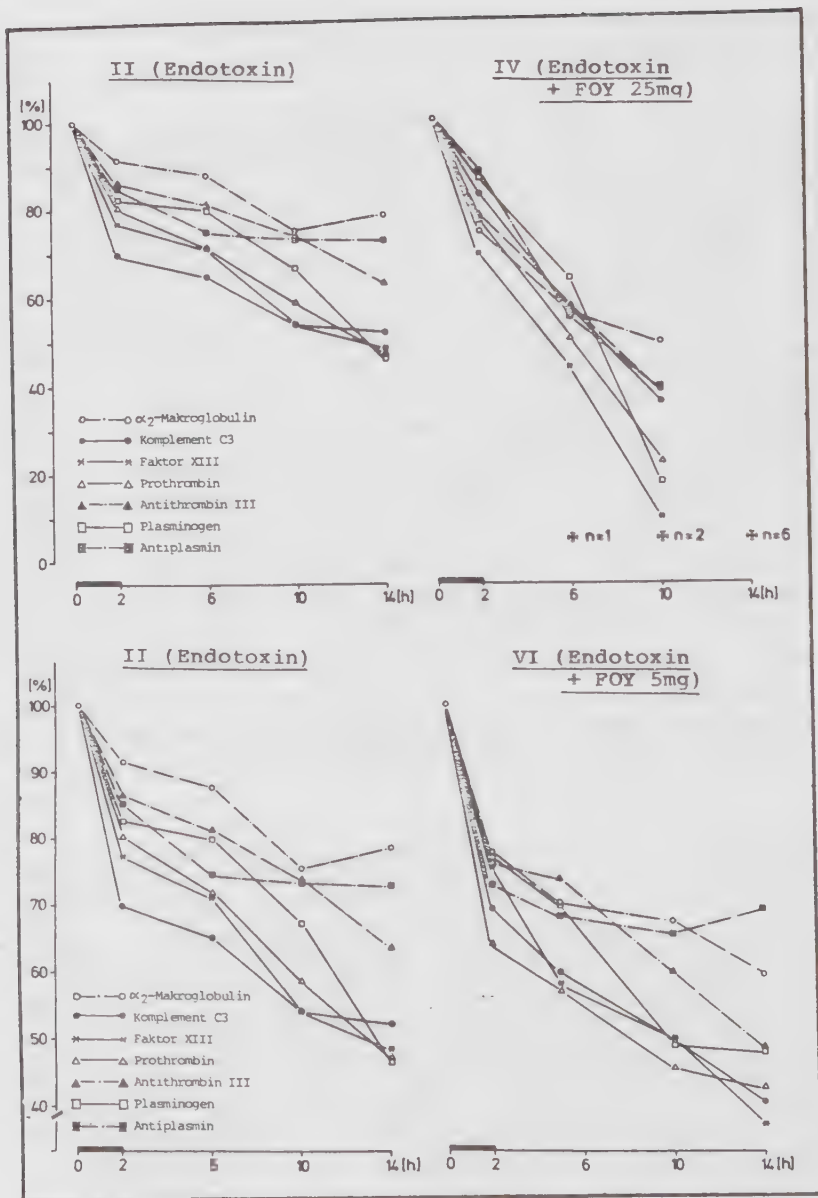


Abbildung 12. Konzentrationsverlauf der Plasmaproteine (Mittelwerte) in den Gruppen II, IV und VI.

aller Plasmaproteinkonzentrationen nach Endotoxinverabreichung erheblich niedriger als die entsprechenden Werte der Endotoxingruppe II lagen. Statistisch signifikant ($p < 0,05$) wurde dies bei den 10h-Werten von AT III, F XIII und Plasminogen (Tab. 11, 12; Abb. 11).

In Gruppe VIII (Tab. 11) zeigten sich nahezu parallele Ergebnisse zur Gruppe VII (Tab. 9). Es trat wieder ein hochsignifikanter Abfall des Plasminogens nach Start der FOY-305-Endotoxin-Infusion auf ($p < 0,005$). Zusätzlich erfolgte nach einem initialen Abfall in den ersten 6 Stunden des Beobachtungszeitraums ein erneuter Anstieg der Antiplasminkonzentrationen, die nach 14 Stunden nahezu Ausgangswerte erreichten. Dies ließ sich beim 10h-Wert statistisch belegen ($p < 0,05$). Alle anderen Konzentrationsverläufe unterschieden sich nicht wesentlich von der Endotoxingruppe (Abb. 13; Tab. 11, 12).

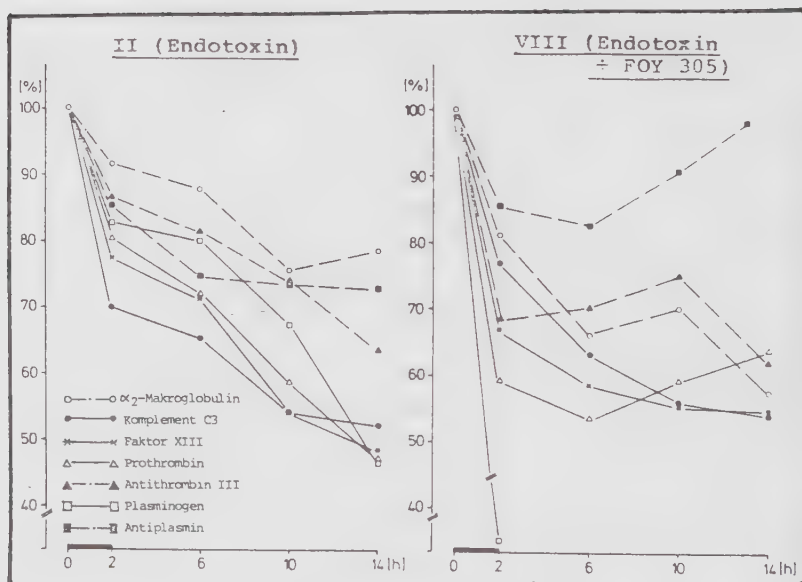


Abbildung 13. Konzentrationsverlauf der Plasmaproteine (Mittelwerte) in Gruppe II und VIII.

Tabelle 9. Mittelwerte $\pm$ SEM der Plasmaproteine in den Gruppen I, III, V, VII ausgedrückt in % des jeweiligen 0-Stundenwertes.

PARAMETER	TESTZEIT	I (Kontrolle)	III (FOY 25 mg)	V (FOY 5 mg)	VII (FOY-305)
Antithrombin III	0	100	100	100	100
	2	105.0 $\pm$ 2.1	90.8 $\pm$ 2.8	95.7 $\pm$ 4.1	94.2 $\pm$ 6.1
	6	107.3 $\pm$ 7.7	83.8 $\pm$ 4.0	87.7 $\pm$ 3.7	98.4 $\pm$ 5.5
	10	102.4 $\pm$ 2.2	85.0 $\pm$ 2.2	87.7 $\pm$ 2.4	92.3 $\pm$ 3.3
	14	101.6 $\pm$ 8.3	77.4 $\pm$ 6.4	86.6 $\pm$ 4.5	83.6 $\pm$ 3.6
Prothrombin	0	100	100	100	100
	2	102.9 $\pm$ 2.0	97.6 $\pm$ 4.6	97.8 $\pm$ 3.1	95.0 $\pm$ 5.8
	6	102.1 $\pm$ 3.7	91.1 $\pm$ 5.4	95.1 $\pm$ 6.0	87.8 $\pm$ 3.4
	10	98.2 $\pm$ 4.1	77.3 $\pm$ 9.5	88.0 $\pm$ 7.8	88.0 $\pm$ 3.4
	14	94.9 $\pm$ 4.0	73.3 $\pm$ 5.9	83.0 $\pm$ 9.0	96.3 $\pm$ 5.4
Faktor XIII	0	100	100	100	100
	2	92.9 $\pm$ 5.0	83.9 $\pm$ 6.6	85.3 $\pm$ 5.1	99.0 $\pm$ 5.9
	6	87.6 $\pm$ 6.9	88.3 $\pm$ 2.7	90.4 $\pm$ 5.9	98.5 $\pm$ 10.6
	10	86.9 $\pm$ 5.0	83.6 $\pm$ 5.4	89.1 $\pm$ 7.4	79.1 $\pm$ 7.9
	14	87.9 $\pm$ 4.5	68.0 $\pm$ 3.2	87.3 $\pm$ 8.5	78.1 $\pm$ 6.4
Antiplasmin	0	100	100	100	100
	2	99.3 $\pm$ 2.0	93.3 $\pm$ 5.6	98.2 $\pm$ 3.4	86.8 $\pm$ 5.6
	6	102.3 $\pm$ 3.5	88.0 $\pm$ 4.3	92.8 $\pm$ 2.3	95.3 $\pm$ 4.4
	10	101.5 $\pm$ 3.6	97.1 $\pm$ 4.8	100.8 $\pm$ 3.6	100.1 $\pm$ 6.0
	14	101.1 $\pm$ 3.1	92.7 $\pm$ 13.9	101.9 $\pm$ 4.1	98.7 $\pm$ 5.4
Plasminogen	0	100	100	100	100
	2	97.3 $\pm$ 4.6	87.1 $\pm$ 4.1	89.2 $\pm$ 2.7	2.9 $\pm$ 0.06
	6	100.4 $\pm$ 3.8	85.1 $\pm$ 7.5	91.3 $\pm$ 7.5	4.6 $\pm$ 1.3
	10	99.4 $\pm$ 6.6	91.8 $\pm$ 7.4	86.5 $\pm$ 3.1	3.6 $\pm$ 1.0
	14	84.7 $\pm$ 2.5	76.3 $\pm$ 9.7	77.9 $\pm$ 4.1	2.7 $\pm$ 0.73
α_2 -Makroglobulin	0	100	100	100	100
	2	109.6 $\pm$ 3.8	98.8 $\pm$ 3.6	96.3 $\pm$ 6.0	83.3 $\pm$ 5.0
	6	107.0 $\pm$ 2.5	94.2 $\pm$ 7.2	107.1 $\pm$ 9.0	81.7 $\pm$ 4.4
	10	105.1 $\pm$ 3.4	86.0 $\pm$ 3.6	96.5 $\pm$ 5.7	87.4 $\pm$ 5.6
	14	100.4 $\pm$ 4.3	86.9 $\pm$ 9.3	93.0 $\pm$ 4.6	85.8 $\pm$ 8.7
Komplement C 3	0	100	100	100	100
	2	103.7 $\pm$ 7.6	92.0 $\pm$ 2.3	96.4 $\pm$ 2.7	86.1 $\pm$ 4.3
	6	98.0 $\pm$ 10.1	91.5 $\pm$ 3.8	95.4 $\pm$ 4.6	85.4 $\pm$ 6.4
	10	89.4 $\pm$ 9.6	84.1 $\pm$ 2.7	94.1 $\pm$ 4.7	81.4 $\pm$ 4.8
	14	99.5 $\pm$ 11.1	84.2 $\pm$ 7.2	96.8 $\pm$ 8.5	82.7 $\pm$ 7.5

Tabelle 10. Statistische Signifikanzen beim Vergleich von Gruppe I mit den Gruppen II, III, V, VII.
n.s. = nicht signifikant.
p < 0,05 = signifikant.

PARAMETER	TESTZEIT	II (Endotoxin)	III (FOY 25 mg)	V (FOY 5 mg)	VII (FOY-305)
Antithrombin III	0	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
	2	<0.001	0.05	n.s.	n.s.
	6	0.01	n.s.	n.s.	n.s.
	10	0.005	n.s.	n.s.	n.s.
Prothrombin	14	0.005	n.s.	n.s.	n.s.
	0	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
	2	0.001	n.s.	n.s.	n.s.
	6	0.005	n.s.	n.s.	n.s.
Faktor XIII	10	0.001	n.s.	n.s.	n.s.
	14	0.001	n.s.	n.s.	n.s.
	0	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
	2	0.01	n.s.	n.s.	n.s.
Antiplasmin	6	0.10	n.s.	n.s.	n.s.
	10	0.005	n.s.	n.s.	n.s.
	14	0.001	0.05	n.s.	n.s.
	0	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
Plasminogen	2	0.005	n.s.	n.s.	n.s.
	6	0.001	n.s.	n.s.	n.s.
	10	0.005	n.s.	n.s.	n.s.
	14	0.005	n.s.	n.s.	n.s.
α_2 -Makroglobulin	0	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
	2	0.005	n.s.	n.s.	0.001
	6	0.005	n.s.	n.s.	0.001
	10	0.001	n.s.	n.s.	0.001
Komplement C 3	14	0.001	n.s.	n.s.	0.001
	0	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
	2	0.001	n.s.	n.s.	0.01
	6	0.005	n.s.	n.s.	0.05
	10	0.001	0.05	n.s.	n.s.
	14	0.01	n.s.	n.s.	n.s.
	0	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
	2	0.005	n.s.	n.s.	n.s.
	6	0.005	n.s.	n.s.	n.s.
	10	0.005	n.s.	n.s.	n.s.
	14	0.005	n.s.	n.s.	n.s.
	0	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.

(E L L O R E N O K) I

Tabelle 11. Mittelwerte $\pm$ SEM der Plasmaproteine in den Gruppen I, II, IV, VI, VIII ausgedrückt in % des jeweiligen 0-Stundenwertes.

PARAMETER	TESTZEIT	I (Kontrolle)	II (Endotoxin)	IV (Endotoxin + FOY 25 mg)	VI (Endotoxin + FOY 5 mg)	VIII (Endotoxin + FOY 305)
Antithrombin III	0	100	100	100	100	100
	2	105.0 $\pm$ 2.1	86.4 $\pm$ 4.8	78.3 $\pm$ 8.3	76.1 $\pm$ 4.0	68.5 $\pm$ 6.2
	6	107.3 $\pm$ 7.7	81.3 $\pm$ 5.8	57.2 $\pm$ 11.9	73.7 $\pm$ 3.9	69.9 $\pm$ 7.0
	10	102.4 $\pm$ 7.6	74.0 $\pm$ 5.6	38.2 $\pm$ 12.6	59.9 $\pm$ 9.0	74.9 $\pm$ 4.3
	14	101.6 $\pm$ 8.3	63.6 $\pm$ 8.4	---	48.8 $\pm$ 9.7	61.9 $\pm$ 11.0
Prothrombin	0	100	100	100	100	100
	2	102.9 $\pm$ 2.0	80.5 $\pm$ 5.1	77.0 $\pm$ 12.1	64.1 $\pm$ 4.7	59.2 $\pm$ 10.1
	6	102.1 $\pm$ 3.7	71.7 $\pm$ 8.2	49.3 $\pm$ 8.0	57.1 $\pm$ 6.8	53.5 $\pm$ 10.2
	10	98.2 $\pm$ 4.1	58.7 $\pm$ 8.0	22.1 $\pm$ 10.2	45.6 $\pm$ 10.1	59.3 $\pm$ 15.8
	14	94.9 $\pm$ 4.0	47.0 $\pm$ 8.7	---	42.9 $\pm$ 10.5	63.9 $\pm$ 13.3
Faktor XIII	0	100	100	100	100	100
	2	92.9 $\pm$ 5.0	77.3 $\pm$ 3.8	69.4 $\pm$ 12.1	65.5 $\pm$ 3.7	66.8 $\pm$ 6.8
	6	87.6 $\pm$ 6.9	71.2 $\pm$ 5.7	43.5 $\pm$ 8.2	58.1 $\pm$ 5.4	58.3 $\pm$ 5.4
	10	86.9 $\pm$ 5.0	54.0 $\pm$ 7.0	9.5 $\pm$ 8.5	50.2 $\pm$ 9.8	55.6 $\pm$ 7.4
	14	87.9 $\pm$ 4.5	48.5 $\pm$ 5.4	---	37.5 $\pm$ 13.1	55.4 $\pm$ 9.8
Antiplasmin	0	100	100	100	100	100
	2	99.3 $\pm$ 2.0	85.2 $\pm$ 4.3	87.5 $\pm$ 18.9	72.9 $\pm$ 6.2	85.5 $\pm$ 7.6
	6	102.3 $\pm$ 3.5	74.7 $\pm$ 4.9	55.2 $\pm$ 9.9	68.2 $\pm$ 6.4	82.3 $\pm$ 10.9
	10	101.5 $\pm$ 3.6	73.5 $\pm$ 6.6	38.0 $\pm$ 3.3	165.5 $\pm$ 9.7	90.6 $\pm$ 5.8
	14	101.1 $\pm$ 3.1	73.0 $\pm$ 10.0	---	69.3 $\pm$ 12.2	98.0 $\pm$ 7.2
Plasminogen	0	100	100	100	100	100
	2	97.3 $\pm$ 4.6	82.6 $\pm$ 4.7	86.8 $\pm$ 11.2	76.8 $\pm$ 5.3	5.9 $\pm$ 2.0
	6	100.4 $\pm$ 3.8	79.9 $\pm$ 5.6	63.5 $\pm$ 10.7	69.9 $\pm$ 3.5	4.1 $\pm$ 1.4
	10	99.4 $\pm$ 6.6	67.2 $\pm$ 4.8	17.7 $\pm$ 9.5	49.3 $\pm$ 9.9	3.2 $\pm$ 1.3
	14	84.7 $\pm$ 2.5	46.6 $\pm$ 6.7	---	48.2 $\pm$ 9.6	2.5 $\pm$ 0.5
α_2 -Makroglobulin	0	100	100	100	100	100
	2	109.6 $\pm$ 3.8	91.6 $\pm$ 2.6	74.7 $\pm$ 6.6	77.7 $\pm$ 4.3	81.0 $\pm$ 6.4
	6	107.0 $\pm$ 2.5	87.9 $\pm$ 5.4	55.9 $\pm$ 11.4	70.3 $\pm$ 3.8	65.8 $\pm$ 9.0
	10	105.1 $\pm$ 3.4	75.5 $\pm$ 5.6	49.1 $\pm$ 3.8	67.5 $\pm$ 7.3	69.7 $\pm$ 2.6
	14	100.4 $\pm$ 4.3	78.7 $\pm$ 6.6	---	59.6 $\pm$ 6.9	57.4 $\pm$ 10.7
Komplement C ₃	0	100	100	100	100	100
	2	103.7 $\pm$ 7.6	69.7 $\pm$ 6.6	82.9 $\pm$ 13.2	69.3 $\pm$ 3.6	76.8 $\pm$ 7.4
	6	98.0 $\pm$ 10.1	65.1 $\pm$ 5.4	56.5 $\pm$ 9.7	59.8 $\pm$ 3.1	63.2 $\pm$ 6.7
	10	89.4 $\pm$ 9.6	54.0 $\pm$ 4.7	35.9 $\pm$ 0.2	49.7 $\pm$ 6.0	58.0 $\pm$ 6.0
	14	99.5 $\pm$ 11.1	51.9 $\pm$ 8.7	---	43.8 $\pm$ 10.8	54.0 $\pm$ 13.7

Tabelle 12. Statistische Signifikanzen beim Vergleich von Gruppe II mit den Gruppen IV, VI, VIII ausgedrückt in % des jeweiligen 0-Stundenwertes.

n.s. = nicht signifikant

$p < 0,05$ = signifikant

PARAMETER	TESTZEIT	IV (Endotoxin + FOY 25 mg)	VI (Endotoxin + FOY 5 mg)	VIII (Endotoxin + FOY-305)
Antithrombin III	0	n.s.	n.s.	n.s.
	2	n.s.	n.s.	n.s.
	6	n.s.	n.s.	n.s.
	10	0.05	n.s.	n.s.
Prothrombin	14	†	n.s.	n.s.
	0	n.s.	n.s.	n.s.
	2	n.s.	n.s.	n.s.
	6	n.s.	n.s.	n.s.
Faktor XIII	10	n.s.	n.s.	n.s.
	14	†	n.s.	n.s.
	0	n.s.	n.s.	n.s.
	2	n.s.	n.s.	n.s.
Antiplasmin	6	n.s.	n.s.	n.s.
	10	0.05	n.s.	0.05
	14	†	n.s.	n.s.
Plasminogen	0	n.s.	n.s.	n.s.
	2	n.s.	n.s.	0.001
	6	n.s.	n.s.	0.001
	10	0.005	n.s.	0.001
α ₂ -Makroglobulin	14	†	n.s.	0.005
	0	n.s.	n.s.	n.s.
	2	n.s.	n.s.	n.s.
	6	n.s.	n.s.	n.s.
Komplement C 3	10	n.s.	n.s.	n.s.
	14	†	n.s.	n.s.
	0	n.s.	n.s.	n.s.
	2	n.s.	n.s.	n.s.
	6	n.s.	n.s.	n.s.
	10	n.s.	n.s.	n.s.
	14	†	n.s.	n.s.
	0	n.s.	n.s.	n.s.

(N I X O L O N) II

C. DISKUSSION

Im Verlauf der letzten Jahre wurden in zahlreichen in vitro-Experimenten die inhibitorischen Eigenschaften von FOY auf Serinproteasen untersucht. Ergebnisse liegen speziell über die Hemmwirkung auf Trypsin, Plasma- und Pankreas-Kallikrein, C_1 - und $C_1\bar{F}$ -Esterase, Faktor Xa, Thrombin und Plasmin vor (17, 23, 32). Experimente mit FOY-305 weisen auf ein ähnliches Wirkungsspektrum bei noch stärkerer Hemmung hin: für 50% Inhibition der Esterolyse durch Trypsin, Plasmin und Plasma-Kallikrein sind die molaren Konzentrationen um den Faktor 10^{-2} niedriger, für Thrombin jedoch nur um den Faktor 0,5 (32). Beide Substanzen sind demnach prädestiniert zur Anwendung bei disseminierter intravasaler Gerinnung (DIC), bei der die von FOY bzw. FOY-305 hemmbaren Faktoren pathologisch aktiviert sind.

Unsere in vivo-Untersuchungen erfolgten am Modell der Endotoxinämie beim Hund, das sich bereits in früheren Therapiestudien mit natürlichen Proteinaseinhibitoren wie dem Aprotinin und Bowman-Birk-Inhibitor (BBI) bewährt hatte (9). Durch Endotoxinverabreichung wurde eine beginnende Sepsis mit Verbrauchskoagulopathie induziert. Dies äußerte sich deutlich in der klinischen Symptomatik, dem Verlauf der Leukozytenzahlen, der Hämokonzentration und dem steilen initialen Blutdruckabfall; die Verbrauchskoagulopathie manifestierte sich in dem hochsignifikanten Abfall der ausgewählten Plasmaproteine.

Übersicht über wichtige veröffentlichte Untersuchungen:

Um die Ergebnisse bei Verabreichung von FOY und FOY-305 im hier beschriebenen Hundeexperiment sinnvoll interpretieren zu können, war es notwendig, die vorliegenden Daten den

bisherigen in vitro und in vivo-Experimenten gegenüberzustellen. Es zeigte sich jedoch, daß bereits in vitro-Untersuchungen untereinander meist nicht vergleichbar sind, da zur Messung der Hemmwirkungen unterschiedliche Testsysteme mit unterschiedlichen Enzymaktivitäten eingesetzt wurden. Beispielsweise liegen die molaren Konzentrationen von FOY für 50%-ige Inhibition von Thrombin in einem Bereich von $6,4 \times 10^{-5}$ bis 11×10^{-5} für TAME* (10mM) als Substrat (17, 32), für Fibrinogen als Substrat bei 1×10^{-5} (23). Die klarste Aussage ergibt sich beim Vergleich der K_i -Werte der Komplexe von FOY, die 0,97 μM für Thrombin mit S-2238* als Substrat und 1,6 μM für Plasmin mit S-2251* als Substrat betragen. Die Bereiche für eine wirksame Thrombin- und Plasminhemmung scheinen demnach nahe beieinander zu liegen. Dies könnte bei einer sich entwickelnden DIC von Nachteil sein, wenn Plasmin zu stark gehemmt und somit die Auflösung von Mikrothromben verhindert wird.

Die Bestimmung einer optimalen Inhibitor-dosierung in vivo wird weiterhin erschwert durch die rasche Inaktivierung von FOY, die im Blutplasma den Cholinesterasen zugeschrieben wird (24), die aber bei niedrigen FOY-Konzentrationen (0,5 - 1 μM) auch in dem von uns verwendeten Trypsintest ohne Anwesenheit von Cholinesterase nachweisbar war.

In Rattenplasma beschreiben Ohno et al. (24) eine Halbwertszeit der Wirksamkeit von FOY von 7-8 s bei einer initialen Konzentration von 125 μM FOY; bei höheren Anfangskonzentrationen steigt auch die Halbwertszeit der FOY-Inaktivierung an, bleibt aber im Sekundenbereich. In derselben Studie wurde mittels radioaktiv markiertem FOY und Dünnschichtchromatographie bei einer kontinuierlichen Infusion von 50mg/kg/h ein Plasmaspiegel von etwa 10 μM FOY gemessen;

*s. Abkürzungen.

in dieser Konzentration wäre entsprechend den in vitro-Versuchen eine Thrombinhemmung bereits denkbar.

In einer Studie von Ohara et al. (21), wird jedoch bei der Messung von PT (Prothrombinzeit = Quick) und APPT (aktivierte partielle Thromboplastinzeit) in Rattenplasma mit Inhibitorzusatz eine signifikante Beeinflussung dieser beiden Parameter erst in Konzentrationsbereichen von 120 μ M FOY beobachtet und eine Konzentration von 24 μ M FOY als schwellenwertig bezeichnet. Dieselben Autoren vermuten, daß diese Konzentrationen kurzzeitig durch eine Bolusinjektion von 3,5 mg FOY/kg i.v. erreicht werden können.

Demgegenüber werden bei drei Experimenten (20, 30, 35) mit Ratten unter Endotoxineinwirkung signifikant günstige Auswirkungen von FOY in Dosierungen und Verabreichungsformen postuliert, bei denen oben genannte Plasmaspiegel gar nicht oder nur kurzzeitig erreicht werden können: eine Verbesserung der Überlebenszeit bei einmaliger intraperitonealer Verabreichung ab 8 mg FOY/kg, hingegen eine Verschlechterung der Überlebenszeit ab 125 mg/kg (20); ein signifikant reduzierter Einfluß von Endotoxin auf PT, PTT, Plättchenzahl und glomeruläre Fibrinablagerung ab 1 mg FOY/kg und ein deutlich geringeres Auftreten von Fibrin- bzw. Fibrinogenspaltprodukten sogar schon ab FOY 10^{-6} mg/kg (35). In der letztgenannten Studie (35) wurden dieselben Parameter auch bei intraperitonealer Verabreichung von FOY bis zu 500 mg/kg ohne Endotoxinbehandlung bestimmt. Selbst in der höchsten Dosierung konnte kein Unterschied zur Kontrollgruppe (mit physiologischer Kochsalzlösung) nachgewiesen werden. In der dritten Studie wird eine Verbesserung der Überlebensrate von Ratten durch i.v.-Injektion von FOY 5 mg/kg einige Minuten vor Endotoxinverabreichung beschrieben (30).

Insgesamt deuten sämtliche genannten Versuche darauf hin, daß die Wirkung von FOY im Endotoxinschock durch eine

Hemmwirkung in der Endstrecke des Gerinnungssystems (Faktor Xa, Thrombin) fraglich ist. Außerdem zeigen in vivo-Experimente (20, 35), daß Dosierungen, die etwa über dem Zehnfachen der jeweils als optimal erachteten Konzentration liegen, in den toxischen Bereich gehen. Unsere Hundeexperimente konnten diese Vermutungen weiter erhärten.

Eigene tierexperimentelle Ergebnisse im Vergleich zu Literaturangaben:

Schon die Dosierung von FOY 25 mg/kg/h lag offensichtlich in der Nähe des toxischen Bereichs, da bereits ein Hund in Gruppe III (ohne Endotoxinverabreichung) frühzeitig verstarb und keiner der Hunde in Gruppe IV (mit zusätzlicher Endotoxingabe) den Beobachtungszeitraum überlebte. Die negativen Auswirkungen der hochdosierten FOY-Infusionen zeigten sich gerade auch bei den Proenzymen und Inhibitorproteinen des Gerinnungs- und Fibrinolysesystems, die in Gruppe IV um 35 bis 49% stärker abfielen als in den nur mit Endotoxin behandelten Tieren der Gruppe II (vgl. Mittelwerte der Gruppen II und IV von AT III, Prothrombin, Faktor XIII, Antiplasmin und Plasminogen) (Tab. 9). Dabei konnte eine in vitro-Beeinflussung der genannten Faktoren in unseren Testsystemen unter den angewandten Lagerungsbedingungen ausgeschlossen werden.

Vergleicht man nun diese Ergebnisse mit den Rattenversuchen, in denen die toxische Dosierung über 125 mg/kg i.p. angesetzt wird, so ist anzunehmen, daß die FOY-Inaktivierung in Hundeplasma etwas langsamer vonstatten geht und eher im Bereich von Humanplasma liegt, bei dem die Halbwertszeit 70-80s beträgt (24). Eine noch langsamere Inaktivierung ist unwahrscheinlich, da nach einem in vivo-Hundeexperiment von Kato et al. die signifikante Verlängerung der Gerinnungszeit durch FOY-Infusion (10 mg/kg/min!) 5 min nach Infusionsstop

nicht mehr nachweisbar war (12). Zum Vergleich mit Humanplasma sei ein in vitro-Experiment erwähnt, in dem wirksame FOY-Konzentrationen (10^{-4} M) höchstens 4 min (Verlängerung der Rekalzifizierungszeit) bzw. höchstens 6 min (Verlängerung der PTT) beobachtet werden konnten (12).

Wenn man nun in einem Gedankenexperiment die FOY-Halbwertszeit in Hundeplasma auf 60s festsetzt, die Blutplasmamenge mit 5% des Körpergewichts veranschlagt (6) und annimmt, daß sich der Inhibitor ausschließlich im Blutplasma verteilt, dann errechnet sich für die Infusionsrate von 25 mg/kg/h ein maximaler Plasmaspiegel von 4×10^{-5} M FOY. Pharmakokinetische Studien mit radioaktiv markiertem FOY (15) lassen jedoch auf einen wesentlich größeren Verteilungsraum schließen, außerdem dürften in unserem Experiment auch Verluste der Hemmaktivität in der Infusionslösung durch die lange Infusionsdauer ins Gewicht fallen (vgl. Trypsintest nach Vorinkubation von FOY-Glukoselösung Abschnitt 1.1.2), so daß in vivo die FOY-Konzentrationen im Plasma wahrscheinlich noch viel niedriger sind. Eine antikoagulierende Wirkung des Inhibitors scheint somit auch in unserem Experiment nahezu ausgeschlossen. Dies trifft insbesondere auch für die niedrige FOY-Dosierung zu, bei der jedoch keine eindeutige Verschlechterung der Überlebensrate und der gemessenen Parameter eintrat. Da auch nur ein einziger Wert signifikant günstiger als in der Kontrollgruppe war (geringerer Blutdruckabfall nach 2h Endotoxininfusion), muß angenommen werden, daß diese Dosierung noch schwellenwertig zum toxischen Bereich war und mögliche günstige Effekte nicht zur Geltung kamen.

Mögliche Wirkmechanismen von FOY und FOY-305:

Für die Tierexperimente und klinischen Studien, die Verbesserung der Überlebenszeiten und Milderung der

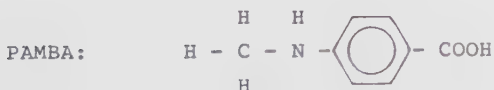
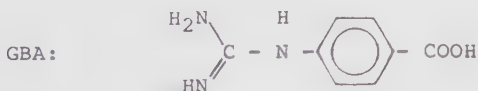
Verbrauchskoagulopathie beim Endotoxinschock durch Gabe von FOY in stark variierenden Dosierungen und Verabreichungsformen beschreiben (12, 30, 31), müssen wohl ganz andere Mechanismen als Antikoagulation und Antifibrinolyse erwogen werden (s.u.). Beispielsweise untersuchten Oda et al. (19), die Stabilität von lysosomalen Membranen (Lysosomenfraktion aus Rattenlebern in 0,7 M Sucrose) in Anwesenheit von FOY und stellten in vitro eine signifikant geringere Freisetzung von saurer Phosphatase, β -Glukuronidase und Kathepsin D fest. Da die erforderliche FOY-Konzentration im Sucrose-Medium allerdings 10^{-3} M betrug, ist es nicht erstaunlich, daß diese Wirkung in vivo bei Ratten mit FOY-Infusionen von 50 mg/kg/h i.v. nicht erzielt werden konnte.

Weiteren Aufschluß über Wirkmechanismen der hier untersuchten synthetischen Inhibitoren geben die Experimente mit FOY-305. Zunächst seien nochmals die in vitro-Untersuchungen von Tamura et al. (32), erwähnt, denen zufolge FOY-305 eine Plasmin-hemmende Wirkung bereits in einer Konzentration ausübt, die hundertfach niedriger liegt als bei FOY, wohingegen die Konzentrationen für die Thrombinhemmung nur 1/5 der von FOY betragen (die Messung der Plasmin- bzw. Thrombinhemmung erfolgte für beide Inhibitoren in jeweils identischen Testsystemen).

Eine Übertragbarkeit auf in vivo-Verhältnisse ist jedoch wiederum schwierig, da FOY-305 zumindest nach oraler Einnahme rasch zu FOY-251 metabolisiert wird (1) und für diese Substanz keine entsprechenden in vitro-Daten verfügbar sind. Die Metabolisierung wie auch der weitere Abbau zu Guanidino-Benzoesäure erfolgt wie bei FOY durch Spaltung von Esterbindungen und findet sehr wahrscheinlich auch bei i.v.-Infusion im Plasma durch Plasmaesterasen statt. Die Ergebnisse des Antiplasmin-tests (Abschnitt 1.2.2) weisen zusätzlich auf eine Abschwächung der Hemmwirkung von FOY-305 in

Plasma hin, die möglicherweise durch Bindung des Inhibitors an Plasmaproteine bedingt ist.

Bei den in vivo-Wirkungen in unserem Hundeexperiment war am auffälligsten der starke Abfall der Plasminogenkonzentrationen, der bereits nach 2 Stunden Infusion von FOY-305 in den Gruppen VII und VIII hochsignifikant war. Im in vitro-Experiment mit direktem Einsatz von FOY-305 in den Plasminogentest konnten ähnlich niedrige Werte nur in Dosierungen erreicht werden, die einer Konzentration im Plasma von 2×10^{-4} M entsprachen. In vivo hätten nach 2 Stunden entsprechende Plasmaspiegel nur erreicht werden können, wenn FOY-305 weder abgebaut noch ausgeschieden würde und eine Verteilung des Inhibitors auf Blutplasma (= 5% des KG) beschränkt bliebe. Ein zu erwartender spiegelbildlicher Anstieg der Antiplasminwerte, wie er in vitro in diesen Konzentrationen erfolgte (s. Abschnitt 1.2.2), war nicht zu beobachten. Folglich mußten die niedrigen Plasminogenwerte im Hundeplasma durch eine Hemmung der Plasminogenaktivierung im Testsystem bedingt sein. Am ehesten kann diese Wirkung dem FOY-305-Metaboliten Guanidinobenzoessäure (GBA) zugeschrieben werden, da dieser eine große strukturelle Ähnlichkeit mit p-Aminomethylbenzoessäure (PAMBA), einem der stärksten synthetischen Fibrinolyseinhibitoren aufweist.



Es ist möglich, daß auch in vivo eine Hemmung der Plasminogenaktivierung durch FOY-305 und dessen Abbauprodukte auftritt und ein starke Antifibrinolyse bewirkt. Eine starke Antifibrinolyse ohne Antikoagulation bei Endotoxinämie wird jedoch als ungünstig angesehen und könnte mit dazu beitragen haben, daß zwei Hunde in Gruppe VIII den Beobachtungszeitraum nicht überlebten.

Der Anstieg der Antiplasminwerte nach 10h und 14h in Gruppe VIII könnte demzufolge tatsächlich einen geringeren Verbrauch des natürlichen Inhibitorproteins während Endotoxinämie widerspiegeln. Eine Beeinflussung des Testsystems durch den synthetischen Inhibitor ist hierbei nahezu ausgeschlossen, da zum einen die in vitro-Experimente (Abschnitt 1.2) einen weitgehenden Verlust der Antiplasminaktivität von FOY-305 in Plasma nach Einfrieren und Wiederauftauen zeigten, zum anderen in Gruppe VII mit identischer FOY-305-Infusionsrate ein ähnlicher Anstieg der Antiplasminwerte nicht auftrat. Eine sichere Aussage wäre allerdings nur mit Hilfe immunologischer Tests zu treffen.

Wirkungen auf das Gerinnungssystem in vivo konnten analog zur Anwendung von FOY nahezu ausgeschlossen werden, da für eine Hemmung von Thrombin und Faktor Xa in Plasma nach in vitro-Experimenten von Stemberger et al. (29), FOY-Konzentrationen von 1×10^{-3} M erforderlich sind. In unserem in vivo-Experiment wurden diese Mengen sicherlich nicht erreicht: Wenn man Plasmaspiegel ähnlich wie für FOY berechnet und für die Halbwertszeit von FOY-305 diejenige des Metaboliten FOY-251, also 80 min, einsetzt, ergeben sich Konzentrationen im Plasma von maximal 3×10^{-4} M.

Wie bei FOY mehren sich inzwischen Hinweise auf Wirkungen von FOY-305, die unabhängig von einer Proteinaseinhibition sind und schon bei niedrigen in vivo-Konzentrationen

auftreten können. Den interessantesten Aspekt eröffnet eine Reihe von in vitro- und in vivo-Experimenten von Adler et al. (1), bei denen die Beeinflussung der Enzymsekretion des Pankreas durch FOY-305 mit und ohne Caerulein-Stimulation untersucht wurde. Die Autoren konnten nachweisen, daß bei in vitro-Konzentrationen von 1×10^{-6} M FOY-305 die Passage von zahlreichen Proenzymen der Pankreasproteine in den Extrazellulärraum bis zu 40% gehemmt wurde. Auch beim in vivo-Experiment mit Ratten konnte unter FOY-305-Infusion von 5 mg/kg/h ein um 30% höherer intrazellulärer Enzymgehalt festgestellt werden. Es wird betont, daß ausschließlich die Freisetzung von sauren Proteinasen gehemmt wurde, der Effekt jedoch nicht abhängig von einer Hemmwirkung am aktiven Zentrum war. Zudem muß berücksichtigt werden, daß bei den in vivo-Untersuchungen die Basalsekretion der Pankreasproteine nur während der ersten 30 min der FOY-305-Infusion supprimiert wurde, danach jedoch trotz kontinuierlicher Infusion wieder bis auf die Ausgangswerte anstieg.

Neben anderen Proteinen wurde beispielsweise die Freisetzung einer Proelastase verhindert. Es wäre also denkbar, daß auch während der Endotoxinämie die Freisetzung leukozyitärer Proteinasen wie Elastase gehemmt wird, also desjenigen Enzyms, das zusammen mit Kathepsin G hauptverantwortlich für die unspezifische Proteolyse in der Septikämie/Endotoxinämie gemacht wird (5, 9, 11, 28). Im hier beschriebenen Hundeexperiment konnte aber kein Anhalt für eine Inhibierung der Freisetzung von leukozytären Proteasen gewonnen werden, da der Verbrauch der gemessenen Plasmaproteine während Endotoxinämie durch FOY-/FOY-305-Infusionen nicht gemildert, sondern bei hochdosierter FOY-Gabe im Gegenteil noch verstärkt wurde. Auch eine Hemmung am aktiven Zentrum freigesetzter leukozyitärer Proteasen durch FOY und FOY-305 ist auszuschließen, da Elastase nur in sehr hohen Konzentrationen zu

höchstens 60% und Kathepsin G überhaupt nicht inhibiert wird (34).

RESÜMEE

Da der Gesamtverlauf der Endotoxinämie in keiner der drei Inhibitor-behandelten Gruppen unter Berücksichtigung aller Beobachtungen als günstig beurteilt werden kann, ist eine klinische Anwendung der FOY-Präparate keinesfalls empfehlenswert und aus der Sicht der Endotoxin-ähnlichen Wirksamkeit - den Verbrauch der Plasmaproteine betreffend - bei hoher Dosierung geradezu kontraindiziert. Diese Aussage wird durch die unter FOY + Endotoxin eindeutig erhöhte Letalitätsrate gestützt. Da bei der Sepsis die Prognose ohnehin schlecht ist, dürften unseres Erachtens Substanzen, deren Wirksamkeit in vivo derart unklar und offenbar auch toxisch ist, nicht für die Behandlung in der Humanmedizin eingesetzt werden.

D. ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Arbeit wurde die inhibitorische Wirksamkeit der synthetischen Proteinasehemmstoffe FOY und FOY-305 im Hinblick auf einen therapeutischen Einsatz in der Humanmedizin untersucht. Diese Hemmstoffe reagieren mit den Enzymen unter Bildung inaktiver Acyl-Enzym-Komplexe.

In vitro-Experimente

1.

Die Instabilität von FOY bzw. des Acyl-Enzym-Komplexes in Lösung wurde im Trypsin-Hemmtest bestätigt:

Eine 50%-ige Hemmung des vorgelegten Trypsins durch FOY wurde innerhalb von 5 Minuten vollkommen aufgehoben (Dissoziation des Acyl-Enzym-Komplexes).

Die initiale 50%-ige Hemmung verminderte sich auf 15% durch 80-minütiges Stehen der FOY-Lösung vor Einsatz in den Trypsin-Hemmtest (Hydrolyse von FOY zu inaktiven Produkten).

Der Einfluß des pH-Wertes (4,3 bzw. 7,4) der 5%-igen Glukose-Stammlösung auf die Stabilität des Inhibitors erwies sich als unerheblich.

2.

FOY-305 zeigte nach 80-minütigem Stehen in Glukoselösung eine geringere Abnahme der Hemmaktivität als FOY:

Die initiale 50%-ige Trypsinhemmung verringerte sich nur auf 35%, unabhängig vom pH-Wert (4,3 bzw. 7,4) der FOY-305-Stammlösung. Innerhalb der Testzeit (8 Minuten) blieb die Anfangshemmung von Trypsin voll erhalten (keine Dissoziation dieses Acyl-Enzym-Komplexes).

3.

FOY-305 ($> 10^{-5}$ M) in Plasmaproben wirkte sowohl als Plasminhemmstoff als auch als Inhibitor der Plasminogenaktivierung:

Die Hemmwirkung auf die Plasminogenaktivierung blieb auch nach Einfrieren der Plasmaproben unverändert erhalten, während die Antiplasminaktivität von FOY-305 durch diese Prozedur weitgehend zerstört wurde.

Die Antiplasminwirkung von FOY-305 im Plasma erfuhr im Vergleich zu FOY-305 in Glukoselösung eine starke Minderung, möglicherweise bedingt durch Bindung des Inhibitors an Plasmaeiweiß.

In vivo-Untersuchungen

1.

Durch 2-stündige i.v.-Gabe von E. coli-Endotoxin (0,5 mg/kg/h) wurden in Hunden die typischen Symptome einer Sepsis mit Verbrauchskoagulopathie induziert.

2.

Eine gleichzeitige Infusion von FOY bzw. FOY-305 (je 5 mg/kg/h) über den gesamten Experimentierzeitraum (14h) beeinflusste die Sepsis-induzierten Veränderungen von Blutdruck, Blutzellen, Hämatokrit und speziellen Plasmaproteinen (Antithrombin III, Faktor XIII, Prothrombin, Antiplasmin, Plasminogen, Komplement C3, α_2 -Makroglobulin) entweder nicht oder in ungünstiger Weise.

3.

Eindeutig deletäre Auswirkungen zeigte die Verabreichung von FOY in einer Dosis von 25 mg/kg/h:

Ohne Endotoxin verstarben Tiere frühzeitig, bei gleichzeitiger Gabe von Endotoxin und Inhibitor überlebte kein Tier den vorgesehenen Untersuchungszeitraum von 14h. Dabei verschlechterten sich nicht nur klinische und hämatologische Parameter, auch der Endotoxin-induzierte Verbrauch der gemessenen Plasmaproteine wurde massiv verstärkt.

Resümee

Eine klinische Anwendung der Proteinasehemmstoffe FOY und FOY-305, insbesondere bei Sepsis, ist derzeit nicht empfehlenswert.

LITERATUR

1. Adler G., Rausch U., Weidenbach F., Arnold R., Kern H.F.: Allgemeine und Protein-spezifische Hemmung des Sekretionsprozesses im exokrinen Pankreas durch einen Proteinase-Inhibitor (FOY-305). *Kli. Wo.*, Vol. 62, No. 9, S.406-412 (1984).
2. Bohn H., Haupt H.: Eine quantitative Bestimmung von Faktor XIII mit Anti-Faktor XIII-Serum. *Thromb. Diath. haemorrh.* 9, S.309 (1968).
3. Chase T., Jr., Shaw E.: Titration of Trypsin, Plasmin, and Thrombin with p-Nitrophenyl p'-Guanidinobenzoate HCl. In: Perlmann G.E., Lorand L. (Hrsg.): *Proteolytic Enzymes. Methods in Enzymology XIX*, S. 20-27 (1970).
4. Collen D., Wiman B., Verstraete M. (Hrsg.): *The physiologic inhibitors of blood coagulation and fibrinolysis*. Elsevier/North Holland Biomedical Press, Amsterdam (1979).
5. Egbring R., Havemann K.: Possible role of polymorphonuclear granulocyte proteases in blood coagulation. In: Havemann K., Janoff A. (Hrsg.): *Neutral proteases of human polymorphonuclear leukocytes*. Urban & Schwarzenberg, Baltimore/Munich, S.442-458 (1978).
6. Ganong W.F.: *Medical Physiology*. Lange Medical Publications, S.5 (1979).
7. Jeljaszewicz J., Waldström T. (Hrsg.): *Bacterial toxins and cell membranes*. Academic Press, London (1978).
8. Jochum M., Witte J., Duswald H., Neumann S., Fritz H.: *Internationales Symposium über aktuelle Probleme der Notfallmedizin und Intensivtherapie*. Münster, 7. und 8.Mai (1981).
9. Jochum M., Witte, J., Schiessler H., Selbmann H.K., Ruckdeschl G., Fritz H.: *Clotting and Other Plasma Factors in Experimental Endotoxemia: Inhibition of Degradation by Exogenous Proteinase Inhibitors*. *Eur. surg. Res.* 13, S.152-168 (1981).
10. Jochum M., Duswald K.-H., Dittmer H., Fritz H.: *Granulozytäre Elastase als lysosomales Markerenzym für*

pathobiochemische Veränderungen bei entzündlichen Erkrankungen. Berichte der ÖGKC, Jg.7, S.53-59 (1984).

11. Johnsson U., Ohlsson K., Olsson I.: Effects of granulocyte neutral proteases on complement components. Scand. J. Immunol. 5, S.421-426 (1976).
12. Kato I., Kaihatsu N., Shigekiyo M., Nakai Y., Tazima K.: Effect of Gabexate Mesilate (FOY) on Contact Factor Activation. Gendai Iryo, 12, S.505 (1980).
13. Mancini G., Carbonara A.O., Heremans J.F.: Immunochemical quantitation of antigens by radial immunodiffusion. Immunochemistry 2, S.235-254 (1965).
14. Markwardt F.: Synthetic Inhibitors of Fibrinolysis. In: Fibrinolytics and Antifibrinolytics. Handb. Exp. Pharm. 46, S.511-513 (1978).
15. Midgley I., Taylor T., Chasseaud I.F., Bonn R.: Pharmacokinetic studies of FOY. In: Grözingen K.H., Schrey A., Wabnitz R.W. (Hrsg.): FOY-Workshop Düsseldorf 1981: Proteinase-Inhibition. Universitätsdruckerei und Verlag, Dr.C.Wolf & Sohn, München (1982).
16. Müller-Berghaus G., Bohn E., Höbel W.: Activation of intravascular coagulation: the significance of granulocytes and platelets. Br. J. Haematol. 33, S.213-220 (1976).
17. Muramatsu M., Fuji S.: Inhibitory effects of -guanidino acid esters of trypsin, plasmin, plasma-kallikrein and thrombin. Biochim. Biophys. Act, 268, S.221-224 (1972).
18. Noack E.: Pharmakologische Grundlagen zur therapeutischen Anwendbarkeit von Gabexatmesilat (FOY). In: Grözingen K.H., Schrey A., Wabnitz R.W. (Hrsg.): FOY-Workshop Düsseldorf 1981: Proteinase Inhibition. Universitätsdruckerei und Verlag, Dr.C.Wolf & Sohn, München (1982).
19. Oda T., Miyawaki T., Sameshima T., Miyao J., Arai Y., Yoshimine K., Yoshimura N.: Antishock Effect of Gabexate Mesilate (FOY). In: Molecular and Cellular Aspects of Shock and Trauma. Alan R. Liss, Inc., New York (1983).
20. Ogawa R., Ishizaki K., Fujita T.: Antishock action of Gabexate mesilate. Gendai Iryo 11, S.1369-1373 (1979).

21. Ohara K., Yamamura M. Yamamoto M.: Effect of FOY in Intravascular Coagulation in Rats. Blood & Vessel 10, S.623 (1979).
22. Ohlsson K.: Interaction of granulocyte neutral proteases with alpha1-antitrypsin, alpha2-macroglobulin and alpha1-antichymotrypsin. In: Havemann K., Janoff A. (Hrsg.): Neutral proteases of human polymorphonuclear leukocytes. Urban & Schwarzenberg, Baltimore/Munich S.167-177 (1978).
23. Ohno H., Kosaki J., Kambayashi S., Imaoka S., Hirata F.: FOY as a serine proteinase inhibitor. Inhibition of thrombin and factor Xa in vitro. Thromb. Res. 19, S.579-588 (1980).
24. Ohno H., Kambayashi J., Chang S.W., Kosaki G.: FOY as a serine proteinase inhibitor. In vivo effect on coagulo-fibrinolytic system in comparison with heparin or aprotinin. Thromb. Res. 24, S.445-452 (1981).
25. O'Neill G.I., Todd J.P.: Extraction of nucleic acid-free lipopolysaccharides from gram-negative bacteria. Nature, London 190, S.344-345 (1961).
26. Saitoh Y.: Clinical results with an oral proteinase inhibitor FOY-305 in chronic pancreatitis. In: Grözinger K.H., Schrey A., Wabnitz R.W. (Hrsg.): FOY-Workshop Düsseldorf 1981: Proteinasen-Inhibition. Universitätsdruckerei und Verlag, Dr.C.Wolf & Sohn, München, S.156-167 (1982).
27. Schmahl F.W., Lasch H.G.: Internationales Symposium - der septische Schock. 21. und 22.Mai 1976, S. 123-136 (1976).
28. Schmidt W., Egbring R., Havemann K.: Effect of elastase-like neutral proteases from human granulocytes on isolated clotting factors. Thromb. Res. 6: 315-326 (1974).
29. Stemberger A., Stöhr R., Ascherl R., Wendt P., Haas S., Blümel G.: Einfluss von FOY auf die Proteolyse-Mechanismen von Gerinnung und Fibrinolyse. In: Grözinger K.H., Schrey A., Wabnitz R.W. (Hrsg.): FOY-Workshop Düsseldorf 1981: Proteinasen-Inhibition. Universitätsdruckerei und Verlag, Dr.C.Wolf & Sohn, München, S. 203-214.
30. Sumida S.: Experimental studies on the effect of prophylactic proteinase inhibitor therapy on endotoxin shock. Aus: Fuji S., Moriya H., Suzuki T.

(Hrsg.): Kinins II. Plenum Press, New York and London (1979).

31. Taenaka N., Shimada Y., Hirata T., Nishijima M., Takezawa J., Yoshiya I., Kambayashi J.: Gabexate mesilate (FOY) therapy of disseminated intravascular coagulation due to sepsis. *Critical Care Medicine*, Vol. 11, No. 9, 735-738 (1983).
32. Tamura Y., Hirado M., Okamura K., Minato Y., Fuji S.: Synthetic inhibitors of trypsin, plasmin, kallikrein, thrombin, C_1E , and C_1 -Esterase. *Biochim. et Biophys. Acta* 484: 417-422 (1977).
33. Urbaschek B., Urbaschek R., Neter E. (Hrsg.): Gram-negative bacterial infections and mode of endotoxin actions. Springer, Wien/New York (1975).
34. Wendt P., Steger A., Klauser R.I., Gathof A.-G., Blümel G.: Die Inhibition neutraler lysosomaler Proteinasen aus menschlichen Granulozyten durch FOY I und FOY II. In: Grözingen K.H., Schrey A., Wabnitz R.W. (Hrsg.): FOY-Workshop, Düsseldorf 1981: Proteinase-Inhibition. Universitätsdruckerei und Verlag, Dr.C.Wolf & Sohn, München, S. 225-233.

LEBENS LAUF

Cordelia Elisabeth Sever, geb. Wörle

- 3.3.1958 geboren in Augsburg als Tochter von Elisabeth M. Hafenbrädl-Wörle, Zahnärztin, und Walter W. Wörle, Diplomingenieur
- 1964 - 1968 Besuch der Volksschule Neusäß/Augsburg
- 1968 - 1977 Besuch des mathematisch-naturwissenschaftlichen Gymnasiums Neusäß
- 1973 - 1977 Teilstudentin des Augsburger Konservatoriums für Musik
- Juni 1977 Abitur
- September 1977 - Mai 1978 Musikstudium mit Hauptfach Violine an der Fachakademie für Musik in Augsburg
- Mai 1978 - Mai 1984 Medizinstudium an der Ludwig-Maximilian-Universität München
- 1978, 1979 Wekstudentin im Strahlenbiologischen Institut der Gesellschaft für Strahlen- und Umweltforschung, München; im Institut für Biochemie der medizinischen Fakultät der Universität Hamburg
- 1979 Krankenpflegepraktikum im Westkrankenhaus Augsburg
- 1980, 1981, 1982 Famulaturen in Augsburg (Chirurgie); Biberbach (Allgemeinmedizin); Bozen, Italien (Innere Medizin); Kandy, Sri Lanka (Tropenmedizin)
- 1983 - 1984 Praktisches Jahr im Städt. Krankenhaus München-Schwabing (Hämatologie/Innere Medizin); im Klinikum Großhadern, München (Chirurgie); im Kreiskrankenhaus Starnberg (Gynäkologie und Geburtshilfe)
- seit November 1982 Doktorarbeit bei Herrn Prof. Dr. Fritz

März 1983	Eheschließung mit Gregory E. Sever
August 1983	Geburt unseres Sohnes Brendan I. E. Sever
Juli 1984	Bestehen des FMGEMS (Foreign Medical Graduate Examination in the Medical Sciences)
seit November 1984	Wohnsitz in Santa Barbara, California

